

Thèse présentée par Adrien BOES
en vue de l'obtention du titre de Docteur en Sciences.

« Étude des interactions et des régulations au sein du noyau de synthèse du peptidoglycane septal d'*E. coli* »

Année académique 2020-2021

Thèse soutenue le 15/12/2020 devant le jury :

Professeur Denis BAURAIN (Uliège)président
Dr. Mohammed TERRAK (Uliège)promoteur
Professeur Bernard JORIS (Uliège)jury
Dr. Frédéric KERFF (Uliège)secrétaire
Dr. Andrea DESSEN (IBS Grenoble)jury extérieur
Professeur Jean-François COLLET (UCL)jury extérieur

Remerciements :

Tout d'abord, je remercie grandement mon promoteur de thèse, le Dr Terrak, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans de bonnes conditions. Merci pour votre disponibilité, votre écoute et pour les nombreuses discussions qui se sont souvent avérées fructueuses.

Je remercie évidemment le FNRS pour le financement de ces quatre années de doctorat.

Je remercie le jury pour la relecture attentive de ce manuscrit qui m'a permis d'améliorer significativement ce dernier.

Je remercie également Frédéric Kerff et Raphaël Herman pour leur collaboration dans la partie cristallographique de mon travail. Les expéditions au synchrotron furent toujours sympathiques.

Je remercie Loïc Quinton pour son aide et ses conseils dans les expériences de pontages chimiques.

Je remercie tous les étudiant(e)s m'ayant accompagné au cours de ma thèse (Valérian, Manon, Alisson, Zorha, Pauline, Khaled). Je remercie évidemment l'ensemble des (ex-) membres du CIP et des (ex-) doctorant(e)s pour leur aide, leurs conseils et les bonnes soirées trappistes passées ensemble.

Je remercie particulièrement Samir Olatunjii, Sophie Leclercq et Ismahene Dahmane qui m'ont accompagné au sein du laboratoire 1.28 pendant mon mémoire et une partie de ma thèse. Merci pour votre sympathie et votre aide.

Enfin, je remercie mes proches pour m'avoir soutenu dans mon parcours universitaire.

Merci.

Liste des abréviations :

(v/v) : rapport volume/volume.

(w/v) : rapport masse/volume.

μ Ci : le micro-Curie est une unité de radioactivité.

2xYT : milieu de culture « Yeast Tryptone ».

AA : acide aminé.

ADP : adénosine diphosphate.

AFM : « Atomique force microscopy » ou microscopie à force atomique.

AMIN : « « Amidase N-terminal domain ».

aPBP et bPBP : « Penicillin-Binding Protein » de classe A et de classe B.

Atm : atmosphère.

ATP : adénosine triphosphate.

BATCH : « Bacterial Adenylate Cyclase-based Two- Hybrid » ou l'approche double hybride, basé sur la reconstitution de l'adénylate cyclase, est une technique d'évaluation des interactions protéine-protéine *in vivo*.

C55-P et C55-PP : undécaprényle phosphate et undécaprényle pyrophosphate.

CCD : « constriction control subdomain».

CCM : chromatographie sur couche mince.

CHAPS : 3-[diméthylammonio]-1-propanesulfonate.

Cryo-EM : cryomicroscopie électronique.

Cryo-TEM : cryotomomicroscopie électronique.

CTP : cytidine triphosphate.

Dcw : « Division and cell wall » est le nom donné au cluster regroupant la plupart des gènes de biosynthèse du peptidoglycane et de la division.

DDM : N-Dodecyl- β -D-maltoside.

DE3 : désigne une souche porteuse du lysogène du phage lambda et possédant donc une copie de la T7 RNA polymérase sous le contrôle d'un promoteur lacUV5.

DM : N-Decyl- β -D-Maltoside.

DMSO : diméthylsulfoxyde.

DTDP : 4,4-dithiodipyridine.

EDTA : éthylènediaminetétraacétique.

GDP : guanosine diphosphate.

GlcNAc : *N*-acétylglucosamine.

GTase : glycosyltransférase (ou transglycosylase).

GTP : guanosine triphosphate.

HMW : haut poids moléculaire.

HTS : « High throughput screening » = criblage à haut débit.

IM : « inner membrane » (membrane interne).

IMAC : « Immobilized Metal Affinity Chromatography » ou Chromatographie d'affinité métallique (ex : le Nickel).

IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside.

Kd : constante de dissociation (paramètre thermodynamique).

kDa : kilodalton.

LB : milieu de culture Luria-Bertani.

LDTs : LD-transpeptidase.

LII : Lipide II.

LMW : faible masse moléculaire.

Lpp : lipoprotéine de Braun.

LPS : lipopolysaccharides.

LysY : Lysosyme Y.

MCS : « Multiple cloning site » ou site de clonage multiple.

mDAP (*mesoDAP*): acide diaminopimélique.

MRSA : souche de la bactérie *S. aureus* résistante à la méticilline.

MurNAc : acide *N*-acétylmuramique.

NBD : nitrobenzoxadiazole (fluorophore).

NRPS : « Non-ribosomal peptide synthetase », ce sont les enzymes de synthèse des peptides non synthétisés par le ribosome.

OM : « outer membrane » (membrane externe).

PASTA : « *PBP* and Serine/Threonine kinase Associated » est le nom d'un domaine protéique.

Pb : paire de bases (de l'ADN).

PBP : « Penicillin-Binding Protein ».

PDB : « Protein Data Bank ».

PEG : polyéthylène glycol.

PG : peptidoglycane.

PGA-LM : acides poly- γ -glutamique de faible poids moléculaire.

PMF : force proton-motrice.

POTRA : « polypeptide-transport-associated domain » est le nom d'un domaine protéique retrouvé notamment dans la protéine FtsQ.

PVDF : polyfluorure de vinylidène.

RBS : « Ribosome Binding Site » ou site de liaison du ribosome sur l'ARN messager.

RMN : résonance magnétique nucléaire.

SAXS : « Small Angle X-ray scattering » ou la diffusion de rayons X aux petits angles est une approche structurale de faible résolution.

SDS: dodécylsulfate de sodium.

SDS-PAGE : gel de polyacrylamide en condition dénaturante.

SEDS : famille de protéines auxquelles appartiennent FtsW et RodA (Shape, Elongation, Division and Sporulation).

SOC : milieu de culture « Super Optimal Broth ».

sPG : peptidoglycane septal.

SPOR : « Sporulation-related repeat » est le nom donné au domaine de liaison du peptidoglycane septal retrouvé notamment dans FtsN, DedD, DamX et RlpA chez *E. coli*.

TAE : tampon de migration pour gel d'agarose.

TAT : « Twin-arginine translocation » ou machinerie de transport associé à un motif arginine en N-terminal (S/TRRXFLK). Cette machinerie est associée au transport de protéine déjà replié et possédant souvent un co-facteur (ex. : ions métalliques). Cette machinerie est empruntée notamment par les amidases telles AmiA et AmiC.

TB : milieu de culture « Terrific Broth ».

TEV protéase : protease “Tabacco etch virus”.

TM : segments transmembranaires.

TPase : transpeptidase.

UDP : uridine diphosphate.

UMP : uridine monophosphate.

UppP : undécaprényle-diphosphatase.

UppS : undécaprényle-diphosphate synthase.

Résumé

La division des bactéries à Gram négatif, comme *Escherichia coli*, est un processus coordonné spatiotemporellement et finement régulé. La division nécessite la séparation des chromosomes nouvellement répliqués, l'invagination des deux membranes cellulaires, la biosynthèse du peptidoglycane septal (sPG) et la séparation des deux cellules filles. Ces fonctions sont assurées par une structure macromoléculaire dynamique appelée le divisome, composé d'environ 30 protéines distinctes, dont 12 essentielles, pour la division et le maintien de l'intégrité cellulaire.

Cette thèse s'est focalisée sur la synthèse du sPG et en particulier sur les protéines FtsW, PBP3, PBP1b, FtsBLQ et FtsN du divisome d'*E. coli*. Le complexe FtsW-PBP3 et la protéine PBP1b participent à la biosynthèse du sPG alors que les protéines FtsBLQ et FtsN semblent participer à la régulation de cette synthèse.

Au cours de ce travail, nous avons contribué à une meilleure connaissance du réseau d'interactions qui s'établit entre ces protéines. Par ailleurs, nous avons établi une nouvelle description de la régulation de la biosynthèse du sPG PBP1b-dépendante et en particulier, nous avons mis en évidence le rôle de FtsBLQ dans la régulation de la synthèse du sPG. Ce complexe inhibe l'activité GTase du PBP1b, probablement via FtsL, et inhibe l'activité transpeptidase de PBP3, via FtsQ. La protéine FtsN, quant à elle, lève l'inhibition sur l'activité glycosyltransférase du PBP1b, déclenchant la biosynthèse du sPG PBP1b-dépendante.

En particulier, nous avons montré l'interaction spécifique entre la région essentielle de FtsN (^EFtsN) et la région du PBP1b située entre ses domaines UB2H et glycosyltransférase. Cette région est importante pour la stimulation de l'activité glycosyltransférase du PBP1b et des données *in vivo* confirment l'importance de l'interaction ^EFtsN-PBP1b pour la fonctionnalité du PBP1b.

Enfin, nous avons développé un test spécifique, en anisotropie de fluorescence, pour la mise en évidence de l'interaction d'un dérivé fluorescent du Lipide II avec les protéines PBP1b, FtsW, FtsW-PBP3 et MurJ. Nous avons démontré l'applicabilité de ce test en vue de criblage à haut débit de molécules interférant dans la liaison Lipide II-protéines et/ou liant directement le Lipide II. En outre, ce test a permis de mettre en évidence le mécanisme d'inhibition de l'activité GTase du PBP1b par la squalamine et d'autres aminostéroïdes caractérisées préalablement. En effet, ces molécules semblent se lier au PBP1b empêchant la liaison du Lipide II.

Table des matières

I. Introduction.....	
1 La paroi bactérienne.....	1
1.1 Le peptidoglycane.....	2
1.1.1 Chimie du Peptidoglycane.....	2
1.1.1.1 Modifications des chaines de glycanes	3
1.1.1.2 Variabilité de la portion peptidique :	5
1.1.1.2.1 Variabilité dans le pontage.....	6
1.1.2 Organisation et ultrastructure du PG	7
1.1.3 Biosynthèse du Peptidoglycane.....	8
1.1.3.1 Phase cytoplasmique : biosynthèse des précurseurs solubles.....	8
1.1.3.2 Phase membranaire : synthèse du précurseur membranaire du PG	9
1.1.3.2.1 Synthèse de l'undécaprényle phosphate	10
1.1.3.2.2 Synthèse du Lipide I et du Lipide II.....	10
1.1.3.2.3 Transport du Lipide II : activité flippase	10
1.1.3.3 Phase périplasmique : polymérisation du PG.....	12
1.1.3.3.1 Les PBPs ou « Penicillin-Binding Proteins »	13
1.1.3.3.1.1 Le domaine acyl-sérine transférase des PBPs	14
1.1.3.3.2 Domaine glycosyl-transférase et famille SEDS	15
1.1.4 Remodelage du PG : les hydrolases.....	18
1.1.4.1 Les amidases.....	19
1.1.4.2 Endopeptidases et Carboxypeptidases.....	20
1.1.4.3 Les Muramidases	21
1.1.4.4 Les N-acétylglucosaminidases	21
1.1.4.5 Le recyclage du PG.....	22
1.2 Les complexes impliqués dans la biosynthèse du PG.....	23
1.2.1 Morphogénèse bactérienne et synthèse du PG	23
1.2.2 Complexe de synthèse du PG et cycle cellulaire d' <i>Escherichia coli</i>	31
1.2.2.1 L'élongasome d' <i>Escherichia coli</i>	31
1.2.2.2 Phase de transition entre élongation et division.....	35
1.2.2.3 Le divisome d' <i>Escherichia coli</i>	35
<i>Protéines du divisome recrutées lors de la phase précoce</i>	36
1.2.2.3.1 L'anneau FtsZ.....	37
1.2.2.3.1.1 Positionnement de l'anneau FtsZ.....	39

<i>Le système MinCDE</i>	39
<i>L'occlusion par le nucleoïde</i>	41
<i>Le « Ter Linkage »</i>	42
1.2.2.3.1.2 Ancrage et stabilisation de l'anneau FtsZ.....	43
<i>Les protéines FtsA et ZipA</i>	43
<i>Les protéines Zaps</i>	45
1.2.2.3.2 FtsEX	47
<i>Protéines du divisome recrutées lors de la phase tardive</i>	48
1.2.2.3.3 FtsK	48
1.2.2.3.4 FtsBLQ :.....	50
1.2.2.3.5 Le complexe FtsW-PBP3	52
1.2.2.3.6 Le PBP1b et ses régulateurs	54
1.2.2.3.7 FtsN.....	57
1.2.2.3.8 DamX, DedD et RlpA : autres protéines à domaine SPOR.....	58
1.2.2.3.9 Les amidases (AmiA, B et C) et leurs régulateurs (NlpD, EnvC).....	60
1.2.2.3.10 Le système Tol-Pal : invagination de la membrane externe	62
1.2.2.4 Modèle général de constriction	64
1.2.2.5 Le désassemblage du divisome	65
1.3 Les antibiotiques ciblant la biosynthèse PG	66
1.3.1 Les inhibiteurs des DD-transpeptidases	66
1.3.2 Les inhibiteurs des glycosyltransférases (GTases).....	67
1.3.3 Les inhibiteurs des enzymes cytoplasmiques de la biosynthèse du PG : MurA-F	68
1.3.4 Les inhibiteurs des autres phases membranaires : MurG, MraY, MurJ et les UppS/UppP	68
1.3.5 Les inhibiteurs d'hydrolases	69
1.3.6 Les molécules séquestrant le Lipide II	70
1.3.6.1 Les glycopeptides.....	70
1.3.6.2 Les lipopeptides.....	71
1.3.6.3 Les lantibiotiques.....	71
1.3.6.4 Les défensines	72
1.3.6.5 La teixobactine.....	72
II. Objectifs.....	74
III. Matériels et méthodes :	75
1 Matériels.....	75
1.1 Souches bactériennes.....	75
1.2 Plasmides et oligonucléotides	75

1.3	Purification d'ADN	78
1.4	Milieux de culture.....	78
1.5	Antibiotiques	78
1.6	Détergents, réactifs et enzymes.....	79
1.7	Colonnes et matrices de purification	79
1.8	Western blot.....	80
1.9	Peptides	80
1.10	Appareillages, kits et consommables	80
2	Méthodes	81
2.1	Cellules compétentes et transformation.....	81
2.2	Gel d'agarose	82
2.3	Dosage de l'ADN	82
2.4	PCR et mutagenèse.....	82
2.5	Clonage	82
2.5.1	Restriction et ligation	82
2.5.2	Clonage par la méthode « In fusion ».....	83
2.5.3	Hybridation des oligonucléotides « Oligonucleotide annealing »	83
2.6	Purification de l'ADN plasmidique.....	83
2.7	Production, extraction et purification des protéines et complexes protéiques	84
2.8	SDS-PAGE et Western blot.....	86
2.9	Détermination de la concentration en protéine	86
2.10	Test d'activité GTase avec le Lipide II radioactif.....	86
2.11	Test d'activité GTase en continu avec le Lipide II fluorescent.....	87
2.12	Hydrolyse de S2d par le domaine transpeptidase.....	87
2.13	Interaction de E FtsN avec le PBP1b par anisotropie de fluorescence	87
2.14	Interaction du Lipide II avec des protéines ou des antibiotiques par anisotropie de fluorescence	88
2.15	Pontage chimique « cross-linking »	88
2.16	Cristallographie.....	89
2.17	Complémentation de la souche EJ-801	89
2.18	Microscopie	89
2.19	Réalisation du modèle PBP1b- composé 2	90
IV.	Résultats et discussion	91
1	Chapitre 1 : synthèse du sPG et régulation	91
1.1	Partie 1 : interactions, organisation et régulations	91

1.1.1	Résultats	92
1.1.1.1	Production et purification du complexe FtsBLQ.....	92
1.1.1.2	Évaluation des interactions	93
1.1.1.3	Évaluations des activités et régulations	96
1.1.1.3.1	Effet de FtsBLQ et FtsN sur l'activité du PBP1b.....	96
1.1.1.3.2	Effet de FtsBLQ et FtsN sur l'activité du PBP3.....	99
1.2	Partie 2 : interaction PBP1b-FtsN : nouveaux éléments biochimiques et structuraux	100
1.2.1	Résultats	101
1.2.1.1	Interaction ^E FtsN-PBP1b	101
1.2.1.2	Structure du complexe PBP1b- ^E FtsN	103
1.2.1.3	Mutants et complémentation sur base de la structure	104
1.2.1.4	FtsN et PBP1b : vers un modèle plus complet.....	106
1.2.2	Discussion	107
2	Chapitre 2 : Inhibition de la synthèse du PG : caractérisation d'inhibiteurs et développement d'un nouvel outil de « screening » d'inhibiteurs de la synthèse du PG	111
2.1	Résultats	112
2.1.1	Développement d'un test à haut débit en anisotropie de fluorescence	112
2.1.2	Caractérisation de la squalamine et de dérivés de type aminostéroïdes	116
2.2	Discussion	120
V.	Conclusion et perspectives.....	124
VI.	Bibliographie.....	125
VII.	Publications	160
VIII.	Annexes	223

Table des figures

Figure I.1 : Les parois bactériennes.....	2
Figure I.2 : Structure du PG d' <i>Escherichia coli</i>	3
Figure I.3 : Modification des sucres du PG.....	5
Figure I.4 : Variabilité dans la composition de la partie peptidique et dans le type du pontage du PG.....	7
Figure I.5 : Illustration des étapes de la phase cytoplasmique de biosynthèse du PG chez <i>E. coli</i>	9
Figure I.6 : Métabolisme et transport du Lipide II.....	12
Figure I.7 : Structure et site actif du domaine PBP.....	15
Figure I.8 : Structure du site actif du PBP1b complexé par la moénomycine et mécanisme catalytique proposé pour la réaction de transglycosylation.....	16
Figure I.9 : Modèle de biosynthèse du PG par les aPBPs et le couple SEDS/bPBP.....	17
Figure I.10 : Récapitulatif des activités hydrolytiques des enzymes impliqués dans le remodelage du PG d' <i>E. coli</i>	19
Figure I.11 : Vue générale de la voie de recyclage du PG chez <i>E. coli</i>	22
Figure I.12 : Maintien de la forme bactérienne chez <i>S. aureus</i> et <i>S. pneumoniae</i>	25
Figure I.13 : Modèle du mécanisme majoritaire de maintien de la forme en bâtonnet chez les bacilles....	26
Figure I.14 : Modèle de croissance unipolaire chez <i>A. tumefaciens</i>	27
Figure I.15 : Modèle de croissance bipolaire chez <i>M. tuberculosis</i> et <i>C. glutamicum</i>	28
Figure I.16 : Croissance et morphogénèse chez <i>Caulobacter crescentus</i>	29
Figure I.17 : Déterminant de la morphologie d' <i>Helicobacter pylori</i>	30
Figure I.18 : Croissance et branchage des hyphes chez <i>S. coelicolor</i>	30
Figure I.19 : Représentation schématique des événements du cycle cellulaire d' <i>E. coli</i>	31
Figure I.20 : Vue générale des principaux constituants de l'élongosome et de leurs interactions chez <i>E. coli</i>	32
Figure I.21 : Structure des complexes RodA-PBP2 et MreC-PBP2.....	34
Figure I.22 : Vue générale des principaux constituants du divisome d' <i>E. coli</i> et interdépendance entre ces constituants.....	36
Figure I.23 : Protofilament de FtsZ	39
Figure I.24 : Mécanisme de positionnement de l'anneau FtsZ par le système des protéines Mins.	41
Figure I.25 : Système du « Ter-linkage » et d'occlusion par le nucleoïde.	42
Figure I.26 : Ancrage de FtsZ à la membrane par ZipA et FtsA.....	44
Figure I.27 : Interactions entre les protéines Zaps et FtsZ.	46
Figure I.28 : Organisation structurale de FtsEX.	48
Figure I.29 : Topologie de FtsK et structure du domaine moteur cytoplasmique.....	50
Figure I.30 : Structure de la protéine FtsQ d' <i>E. coli</i> et modèle du complexe FtsBLQ.....	52
Figure I.31 : Structure de PBP3 et topologie de FtsW d' <i>E. coli</i>	54
Figure I.32 : Structure du PBP1b d' <i>E. coli</i> et interactions avec ces protéines partenaires.	56
Figure I.33 : Topologie du FtsN et structure du domaine SPOR C-terminal chez <i>E. coli</i>	58
Figure I.34 : Protéines à domaines SPOR chez <i>E. coli</i>	59
Figure I.35 : Structure d'AmiC, organisation des activateurs à domaine LytM, structure du domaine LytM d'EnvC et modèle d'activation d'AmiB.	61
Figure I.36 : Illustration du système Tol-Pal.	63
Figure I.37 : Modèle général de synthèse du sPG.	64
Figure I.38 : Exemples de β-lactamines (A) et mécanisme de réactions entre une pénicilline et la sérine d'un domaine PBP ou d'une β-lactamase (B).	67

Figure I.39 : Exemples de structures des différentes classes de molécules liant le Lipide II	73
Figure IV.1 : Gel SDS-PAGE des purifications du complexe FtsBLQ, du complexe FtsBL et de la protéine FtsQ.....	92
Figure IV.2 : Résumé des co-expressions réalisées et interactions identifiées.....	94
Figure IV.3 : Résumé des expériences de co-purification.....	95
Figure IV.4 : Évaluation de l'activité TPase du PBP1b en présence de FtsBLQ et FtsN.....	96
Figure IV.5 : Évaluation de l'activité GTase du PBP1b en présence de ces partenaires protéiques.....	97
Figure IV.6 : Évaluation de l'activité GTase du PBP1b en présence de ces partenaires protéiques et mutants.....	98
Figure IV.7 : Évaluation de l'activité TPase de PBP3 en présence de ses partenaires protéiques.....	99
Figure IV.8 : Interaction du peptide ^E FtsN et de FtsN ¹³⁰ avec le PBP1b et stimulation de l'activité GTase.	102
Figure IV.9 : Structure du complexe ^E FtsN-PBP1b.....	104
Figure IV.10 : Étude des mutants du site de liaison de ^E FtsN au PBP1b.....	105
Figure IV.11 : Stabilité et stimulation par LpoB du PBP1b et de son variant R141A/R397A.....	106
Figure IV.12 : Modèle illustrant le rôle du complexe FtsBLQ et de la région ^E FtsN dans la régulation de la synthèse du sPG.....	109
Figure IV.13 : Modèle d'un hypothétique complexe PBP1b- ^E FtsN-LpoB-CpoB.....	110
Figure IV.14 : Évaluation de liaison du LII-NBD aux protéines PBP1b, FtsW, FtsW-PBP3 (W3) et MurJ par anisotropie de fluorescence.....	112
Figure IV.15 : Titrage des complexes LII-NBD-protéine par le LII non marqué et suivi de l'anisotropie de fluorescence.....	113
Figure IV.16 : Liaison des antibiotiques aux LII et titrage des complexes LII-protéines avec ces antibiotiques.....	114
Figure IV.17 Caractérisation des composés analogues du Lipide II.....	115
Figure IV.18 : Structure et caractérisation de la squalamine et de dérivés aminostéroïdes.....	117
Figure IV.19 : Caractérisation de la squalamine et du composé 6.....	118
Figure IV.20 : Modèle du complexe formé entre le domaine GTase du PBP1b et le composé 2.....	119

I. Introduction

1 La paroi bactérienne

La paroi bactérienne est une structure dynamique, entourant la membrane cytoplasmique de toutes les bactéries à l'exception des mycoplasmes (*Rickettsiaceae*, *Anaplasmataceae* et *Mycoplasmataceae*). Elle permet entre autres à la bactérie de résister à sa forte pression osmotique interne et permet d'assurer le maintien de la forme de la bactérie. Un des constituants essentiels et caractéristiques des différents types de parois bactériennes est le peptidoglycane (PG). Chez les *Chlamydiaceae*, du PG est synthétisée uniquement au site de division (Pilhofer *et al.*, 2013 ; Packiam *et al.*, 2015 ; Liechti *et al.*, 2016). On distingue deux grands types de parois permettant de séparer les bactéries en deux groupes : les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les bactéries à Gram positif (**Figure I.1.A**) présentent une paroi composée d'une couche importante (20-80 nm) de PG en contact direct avec l'environnement et séparée de la membrane cytoplasmique par l'espace périplasmique. Le PG de ces bactéries est modifié par la liaison covalente d'acides téichoïques (polymère composé de glycérol ou de ribitol phosphate et de sucre). Un acide téichoïque peut s'associer à un diacylglycérol de la membrane plasmique pour former un acide lipotéichoïque (Prescott *et al.*, 2007 ; Brown *et al.*, 2015). Ces acides lipotéichoïques sont hautement antigéniques et facilitent l'adhésion de la bactérie aux cellules eucaryotes. La paroi des bactéries à Gram négatif est dépourvue d'acides téichoïques (**Figure I.1.B**). Ces bactéries présentent en outre une membrane externe délimitant un large espace périplasmique (30-70 nm) dans lequel se trouve une fine couche de PG (2-7 nm) (Prescott *et al.*, 2007 ; Brown *et al.*, 2015). Dans la membrane externe, on retrouve : des porines facilitant le passage de petites molécules et la lipoprotéine de Braun (Lpp) liant de manière covalente le PG. La membrane externe consiste en une bicouche lipidique asymétrique (Prescott *et al.*, 2007). Le feuillet interne est constitué de phospholipides alors que le feuillet externe est composé de lipopolysaccharides (LPS) fortement antigéniques et participant également au processus d'adhésion aux cellules eucaryotes (Prescott *et al.*, 2007). Les LPS sont constitués de trois parties : le Lipide A, le « core oligosaccharide » et L'Antigène O. Le Lipide A est généralement composé d'un dimère de glucosamine phosphorylé, le « core oligosaccharide » se lie au Lipide A et est composé de divers sucres. Enfin, l'Antigène O est spécifique à une espèce et est de nature polysaccharidique (**Figure I.1.B**) (Prescott *et al.*, 2007 ; Brown *et al.*, 2015).

Les mycobactéries, dont fait partie la bactérie responsable de la tuberculose *M. tuberculosis*, forment un groupe à part, chez les bactéries à Gram positif. En effet, la paroi de ces bactéries est plus complexe et est composée de quatre biomolécules principales : les acides mycoliques, l'arabinogalactane, les lipomannanes/lipoarabinomannanes et le peptidoglycane (**Figure I.1.C**) (Kieser & Rubin, 2014 ; Jankute *et al.*, 2015). Les acides mycoliques sont des acides gras à très longue chaîne, contenant entre 70 et 90 atomes de carbone. Ils jouent un rôle essentiel dans l'architecture et la perméabilité de l'enveloppe cellulaire et sont essentiels à la survie des bactéries (Liu *et al.*, 1996 ; Marrakchi *et al.*, 2014). L'arabinogalactane est une molécule hautement ramifiée se constituant principalement de galactose et d'arabinose liés covalentiellement au PG d'une part et aux acides mycoliques d'autre part (Jankute *et al.*, 2015). Enfin, les lipomannanes/lipoarabinomannanes sont des glycopropholipides associés en grand nombre, non covalentiellement, à la membrane de toutes les espèces de *Mycobacterium* (Jankute *et al.*, 2015 ; Brown *et al.*, 2015).

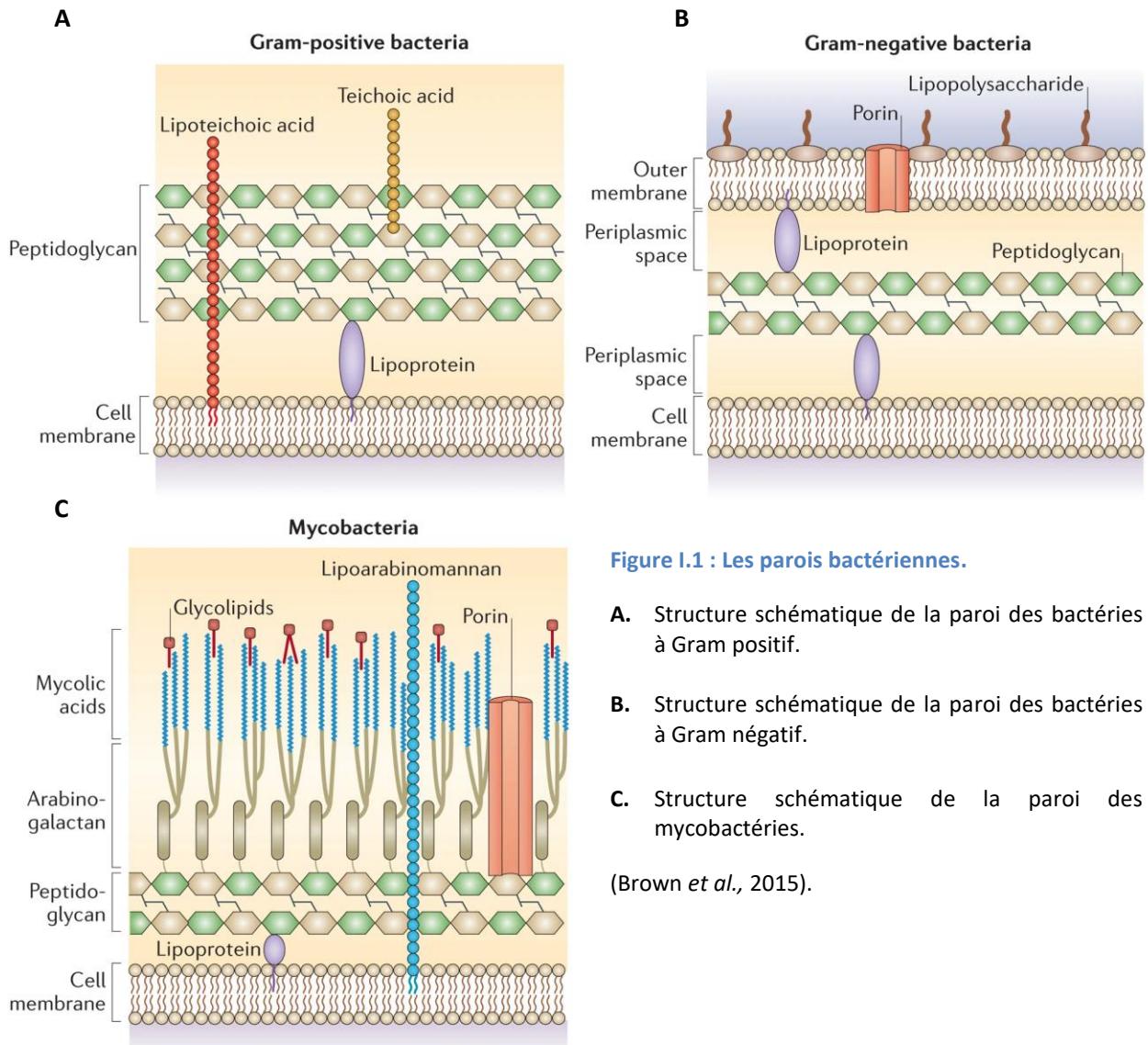


Figure I.1 : Les parois bactériennes.

- Structure schématique de la paroi des bactéries à Gram positif.
- Structure schématique de la paroi des bactéries à Gram négatif.
- Structure schématique de la paroi des mycobactéries.

(Brown *et al.*, 2015).

1.1 Le peptidoglycane

Le peptidoglycane (PG) est le composé caractéristique des parois bactériennes et forme une enveloppe (« *sacculus* ») entourant la bactérie. Le PG est un hétéropolymère constitué de chaînes de glycanes pontées entre elles par de courts peptides (Vollmer *et al.*, 2008a). Le peptidoglycane assure le maintien de l'intégrité de la bactérie, faisant de celui-ci une cible de choix pour les antibiotiques (voir point 1.3). La synthèse du peptidoglycane est réalisée par des complexes multiprotéiques/multienzymatiques agissant tout au long du cycle de croissance et lors de la division de la bactérie. Ces complexes comprennent notamment des enzymes de biosynthèse du PG, des enzymes hydrolytiques, des éléments de cytosquelette et des protéines régulatrices (Vollmer *et al.*, 2008a).

1.1.1 Chimie du Peptidoglycane

Le peptidoglycane (PG) est constitué de chaînes de glycanes de longueur variable. Ces dernières sont formées d'unités disaccharidiques composées de *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide *N*-acétylmuranique (MurNAc) liées entre elles par des liaisons β -1,4. Chaque disaccharide porte un peptide

(tétrapeptide) lié au groupement lactyle du MurNAc et constitué d'une alternance d'acides aminés de configuration L et D (Vollmer *et al.*, 2008a). Le pontage entre les chaines de glycanes voisines s'opère par l'intermédiaire des portions peptidiques donnant au PG une macrostructure « grillagée » : le sacculus (**Figure I.2**). Malgré une structure globalement conservée, le PG présente de nombreuses variations au travers du monde bactérien. On observe des particularités spécifiques à certains genres bactériens, mais également des différences liées à l'adaptation à des facteurs extérieurs (nature du milieu de croissance, exposition à des antibiotiques,...). Ces variabilités s'expriment à la fois dans la composition des chaines de glycane et de la portion peptidique (Vollmer *et al.*, 2008a).

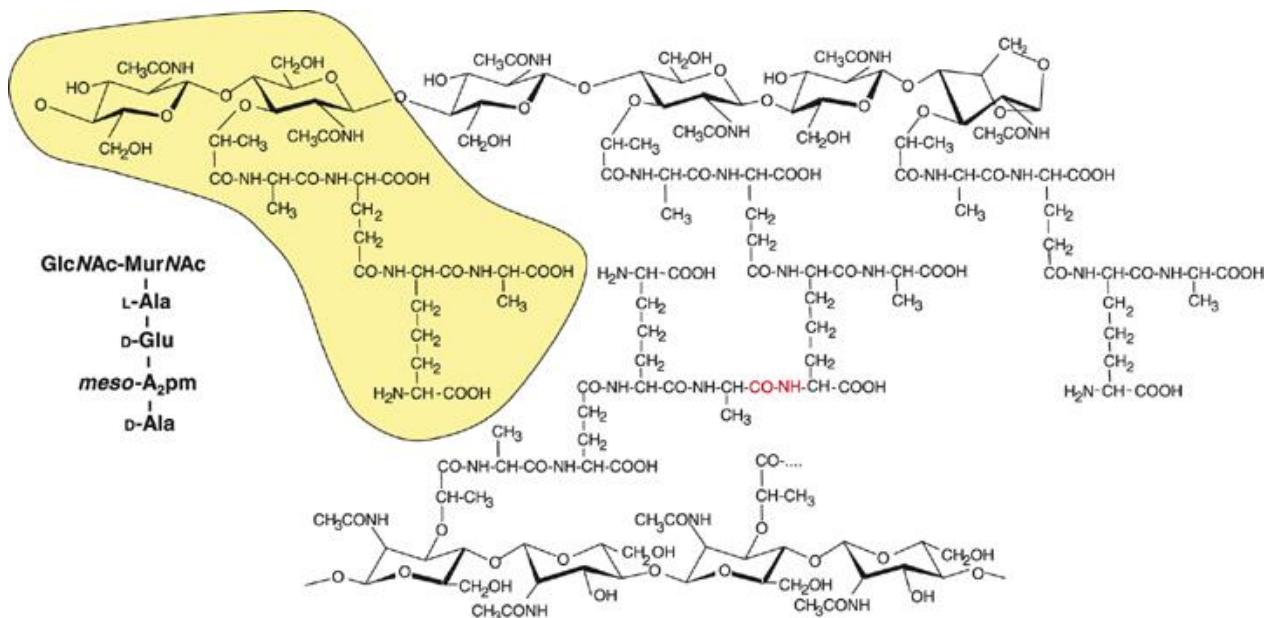


Figure I.2 : Structure du PG d'*Escherichia coli*.

La partie mise en évidence en jaune correspond à l'unité de base de la structure du PG correspondant au GlcNAc-MurNAc-tétrapeptide. Le pontage (montré en rouge) est réalisé par la liaison entre le groupement aminé en position ϵ de l'acide mésodiaminopimélique (*mDAP* ou *meso-A_{2pm}*) en position 3 d'un peptide porté par une chaîne de glycane et le groupement carboxyle de la D-Ala en position 4 porté par une chaîne de glycane voisine (Vollmer *et al.*, 2008b).

1.1.1.1 Modifications des chaînes de glycane

Les chaînes de glycane peuvent subir différentes modifications (résumé sur la **Figure I.3**). Des *N*-déacétylations et *O*-acétylations peuvent s'opérer à la fois sur les GlcNAc et les MurNAc (Vollmer, 2008a). Par ailleurs, des *N*-glycolylations peuvent apparaître sur les MurNAc uniquement (Vollmer, 2008a ; Yadav *et al.*, 2018). La *N*-glycolylation est effectuée pendant la phase cytoplasmique de synthèse des précurseurs du PG contrairement aux *N*-déacétylations et *O*-acétylations qui sont réalisées une fois les chaînes de glycane synthétisées. Ces modifications protègent de manière générale la bactérie vis-à-vis des enzymes de dégradation du PG (Vollmer, 2008a). Chez des bactéries pathogènes, ces modifications empêchent la dégradation du PG et le relargage de fragments pouvant être détecté par le système immunitaire inné de l'hôte (Pazos *et al.*, 2019). L'*O*-acétylation sur le MurNAc est effectuée sur le groupement C6-OH. Chez les

bactéries à Gram positif, cette réaction est catalysée par une *O*-acétyl transferase (OatA) contrairement aux bactéries à Gram négatif dont la réaction nécessite l'action coordonnée de plusieurs enzymes de la famille Pat ou Pac (Weadge *et al.*, 2005 ; Moynihan & Clarke 2010 ; Dillard & Hackett, 2005). Le degré d'*O*-acétylation est compris entre 20-70 % et dépend des espèces et des conditions de cultures. Chez la bactérie à Gram positif *Enterococcus faecalis* l'augmentation du niveau d'*O*-acétylation sur le MurNAc protège la bactérie de l'action lytique du lysozyme au niveau de la liaison β -1,4 et augmente donc la virulence de la bactérie (Chang *et al.*, 2017). Ces *O*-acétylations empêchent également l'action des transglycosylases lytiques (voir point 1.1.4.3). Chez les bactéries à Gram négatif, l'*O*-acétylation du MurNAc module également l'activité des transglycosylases lytiques (Weadge *et al.*, 2005 ; Weadge & Clack 2006). Il existe également des *O*-acétylestérases éliminant les groupements acétyle et permettant de réguler le degré d'acétylation. Chez *Campylobacter jejuni* la délétion du gène de l'acétylestérase *ape1* engendre une hyperacétylation du PG et notamment des défauts de morphologie et de mobilité chez cette bactérie (Ha *et al.*, 2016). L'*O*-acétylation du GlcNAc a également été décrite chez *Lactobacillus plantarum* et engendre l'inhibition de l'autolysine Acm2 (Bernard *et al.*, 2011).

La *N*-déacétylation du GlcNAc a lieu chez la plupart des bactéries à Gram positif et quelques espèces à Gram négatif tel *Shigella flexneri* (Vollmer & Tomasz 2000 ; Boneca *et al.*, 2007 ; Benachour *et al.*, 2012). La PG déacetylase A (PgdA), enlève le groupement acétyle en position C2 du GlcNAc. La délétion de cette enzyme rend la bactérie plus sensible au lysozyme et réduit par conséquent sa virulence (Vollmer & Tomasz, 2000). La *N*-déacétylation peut agir également de manière synergique avec la *O*-acétylation du MurNAc vis-à-vis de la résistance au lysozyme comme observé chez *Listeria monocytogenes* (Boneca *et al.*, 2007 ; Aubry *et al.*, 2011). Enfin, la *N*-glycolylation du MurNAc est observée chez les mycobactéries et les actinomycetales. Cette modification se déroule pendant la phase de synthèse cytoplasmique du précurseur UDP-MurNAc (Pazos *et al.*, 2019). La délétion de *namH*, catalysant la réaction de *N*-glycolylation, augmente la sensibilité de la bactérie au lysozyme et aux β -lactamines (voir point 1.3.1) (Raymond *et al.*, 2005).

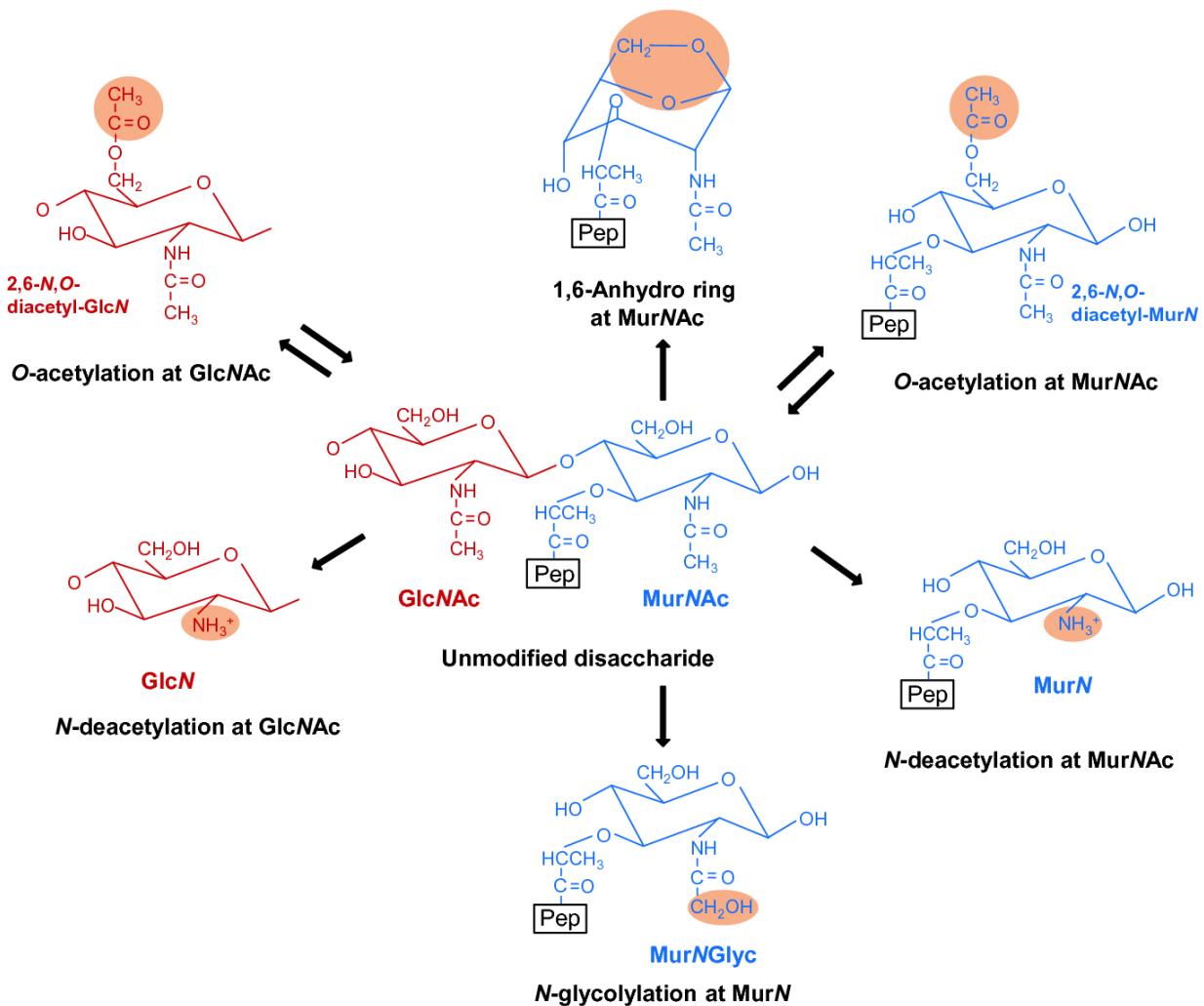


Figure I.3 : Modification des sucres du PG.

L'unité disaccharide-peptide est représentée au centre de la figure et les différentes modifications réalisées sur les sucres sont mises en évidence en couleur chair (voir texte ci-avant) (Pazos & Keller, 2019). PEP : peptide.

1.1.1.2 Variabilité de la portion peptidique :

D'une espèce bactérienne à l'autre, la structure primaire du peptide varie (**Figure I.4**). Chez *E. coli*, c'est un pentapeptide qui est formé de la séquence L-Ala-D-isoGlu-mDAP-D-Ala-D-Ala (iso-Glu : acide iso-glutamique). Dans la majorité des cas, le pontage entre deux peptides, portés par deux chaînes de glycanes voisines, s'opère par la formation d'une liaison amide engageant la fonction acide carboxylique du D-Ala en position 4 du peptide 1 et le groupement ϵ -amine du mDAP du peptide 2. Durant ce processus, la D-Ala terminale du peptide 1 est éliminée du peptide (Vollmer *et al.*, 2008b). Pour la position 1 du peptide, on retrouve chez *Mycobacterium leprae* une glycine replaçant le L-Ala (Mahapatra *et al.*, 2000). Chez les bactéries à Gram positif *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* et chez *Mycobacterium tuberculosis* le D-iGlu en position 2 peut subir une amidation sur la fonction α -carboxylique, catalysée par le complexe MurT/GatD, pour donner la D-iso-glutamine (Zapun *et al.*, 2013 ; Münch *et al.*, 2012 ; Figueiredo *et al.*, 2012 ; Morlot *et al.*, 2018). Il a été démontré que l'amidation de ce résidu favorise la réaction de transpeptidation et que par conséquent les régions non amidées, chez *S. pneumoniae*, sont principalement trouvées dans les régions non pontées du PG (Bui *et al.*, 2012 ; Zapun *et al.*, 2013).

al., 2013). Le même constat a été fait chez *S. aureus* où le manque d'amidation a pu être corrélé avec une diminution du taux de pontage et une sensibilité accrue aux antibiotiques (Boyle-Vavra *et al.*, 2001 ; Figueiredo *et al.*, 2012). La position 3 du peptide présente la plus grande variation dans le monde bactérien bien qu'on retrouve généralement un acide diaminé à cette position. La plupart des bactéries à Gram négatif, des bacilles et des mycobactéries présentent le *mDAP* à cette position. Le *mDAP* est amidé chez *Bacillus subtilis*, *M. tuberculosis* et *Corynebacterium glutamicum* (Atrih *et al.*, 1999 ; Ngadjeua *et al.*, 2018 ; Levefaudes *et al.*, 2015). Chez les spirochètes tel le genre *Borrelia*, le *mDAP* est substitué par l'ornithine. D'autres résidus sont trouvés à cette position parmi lesquels : la D-Lys ou la L-Lys (*Thermatoga maritima*), la méso-lanthionine (*Fusobacterium nucleatum*), le L-Ala (*Erysipelothrix rhusiopathiae*), le L-2,4-diaminobutyrate (*Corynebacterium aquaticum*) et d'autres (Vollmer *et al.*, 2008a). Chez la plupart des bactéries à Gram positif, on retrouve en position 3 une L-Lysine portant souvent quelques acides aminés supplémentaires (2 à 7), variables d'une espèce à l'autre, lié à la fonction ε-amine de la L-Lys et dénomé pont interpeptidique. Chez *S. aureus*, le pont interpeptidique est formé d'un pentapeptide de glycine qui est ajouté sur la L-Lys par la peptidyl-transférase FemXAB (Schleifer et Kandler, 1972 ; Vollmer *et al.*, 2008a). Chez *S. pneumoniae* un dipeptide L-Ala-L-Ala ou L-Ser-L-Ala est greffé sur le L-Lys (Filipe & Tomasz, 2000). La position 4 du peptide est toujours occupée par une D-Ala. Enfin, en position 5 du peptide, on retrouve généralement une D-Ala. Cependant, chez certains entérocoques on retrouve le D-Lactate ou la D-Ser réduisant la liaison de l'antibiotique vancomycine qui lie le D-Ala-D-Ala et bloque la réaction de transpeptidation (voir point 1.3.6.1) (Arthur *et al.*, 1993 & 1996).

1.1.1.2.1 Variabilité dans le pontage

Le pontage le plus courant est de type 4-3, précédemment mentionné, entre le D-Ala en position 4 et le D-*mDAP* (ou L-Lys) en position 3, catalysé par les D,D-transpeptidases qui lient la pénicilline d'où leur nom « Penicillin-Binding Proteins » ou PBPs (voir point 1.1.3.3.1). Néanmoins des variations existent chez certaines bactéries (Figure I.4). Chez les corynebactéries on retrouve un pontage 4-2, peu fréquent, connectant le D-Ala en position 4 et le D-iGlu en position 2 d'un peptide adjacent (Vollmer *et al.*, 2008a). Par exemple, chez *Corynebacterium pointsettiae*, ce pontage implique le D-iGlu en position 2 et la D-Ala en position 4 via un résidu ornithine, nécessaire au pontage des deux fonctions carboxyliques (Schleifer et Kandler, 1972 ; Vollmer *et al.*, 2008a ; Pazos *et al.*, 2019). On retrouve également le pontage 3-3 catalysé par les LD-transpeptidases (LDTs) chez un certain nombre de bactéries. Ce dernier est souvent très minoritaire (chez *E. coli* par exemple), mais est majoritaire chez certains pathogènes tels *Clostridium difficile* et *M. tuberculosis* (Vollmer *et al.*, 2008a). Ce pontage a lieu entre deux *mDAPs* de deux peptides adjacents (Vollmer *et al.*, 2008a). Enfin, un nouveau type de pontage a récemment été décrit chez les actinobactéries se développant dans des conditions acides : le pontage 1-3. Ce dernier implique une amidation de la fonction α-(L)-carboxylique du *mDAP* permettant ensuite le pontage avec L-Ala (Espaillat *et al.*, 2016).

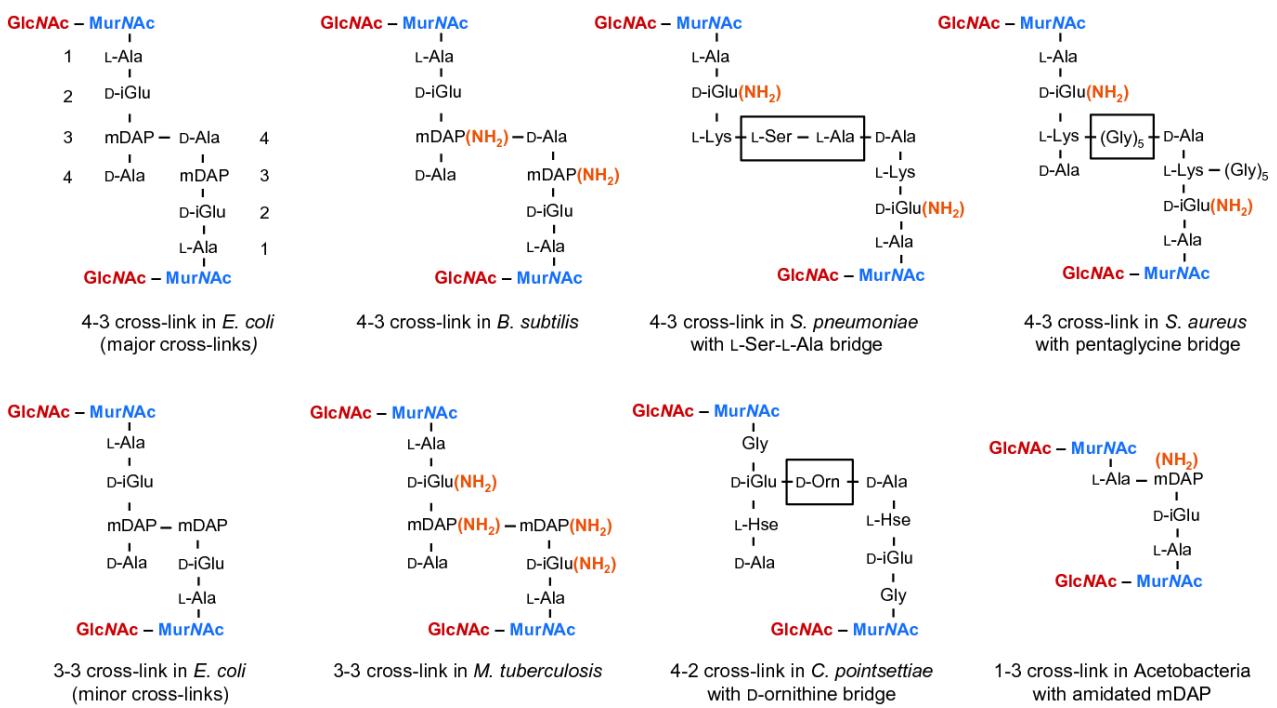


Figure I.4 : Variabilité dans la composition de la partie peptidique et dans le type du pontage du PG.

En orange sont représentées les amidations du mDap ou du D-iGlu (détails dans le texte ci-avant) (Pazos & Keller, 2019).

1.1.2 Organisation et ultrastructure du PG

Le PG forme une structure tridimensionnelle essentielle au maintien de la forme de la cellule bactérienne pendant ses phases de croissance et de division, et ce dans des conditions environnementales changeantes. Notamment, le PG présente une structure dynamique formant des pores permettant la diffusion des protéines périplasmiques (≤ 50 kDa) (Vollmer *et al.*, 2008b). L'épaisseur du PG varie en fonction des espèces et contribue à la rigidité de la paroi. Plus la pression interne de la bactérie est élevée et plus la couche de PG est importante. Chez *E. coli*, la pression osmotique interne peut atteindre 3 atm (Cayley *et al.*, 2000) et jusqu'à 20 atm pour les bactéries à Gram positif *B. subtilis* et *S. aureus* (Whatmore & Reed 1990). Dès lors, l'épaisseur de la couche de PG chez les bactéries à Gram positif est largement supérieure à celle des bactéries à Gram négatif. L'épaisseur de PG d'*E. coli*, mesurée par AFM (« atomic force microscopy ») sur des sacculus intacts, est de 3 nm pour le PG déshydraté et de 6 nm pour le PG hydraté (Yao *et al.*, 1999). Une analyse par Cryo-TEM (« transmission electronic microscopy ») de cellules de *B. subtilis* a révélé deux zones distinctes : une couche de faible densité de 22 nm entourant la membrane cytoplasmique et une couche de haute densité de 33 nm entourant la couche de faible densité (Matias & Beveridge 2005). La zone de haute densité contient, en plus du PG, les acides téichoïques et les protéines associées (Matias & Beveridge 2005, Pazos & Keller, 2019).

Les propriétés mécaniques du PG ont été analysées par différentes techniques. L'élasticité du PG a pu notamment être évaluée par AFM chez *E. coli* (Yao *et al.*, 1999). Il en ressort que l'élasticité du PG hydraté est supérieure à celle du PG déshydraté. Par ailleurs, il a pu être démontré que l'élasticité du PG est anisotrope. En effet, l'élasticité du grand axe est supérieure à celle de l'axe de la circonférence (Yao *et al.*, 1999 ; Turner *et al.*, 2018). Cette observation suggère que les ponts peptidiques du PG sont orientés longitudinalement et que les chaînes de glycane moins élastiques sont orientées le long de la

circonférence de la bactérie comme confirmé par AFM (Yao *et al.*, 1999 ; Turner *et al.*, 2018). Ce modèle d'architecture est renforcé par l'observation que des cellules d'*E. coli* soumises à un choc osmotique subissent une augmentation de volume par un accroissement de longueur et non de diamètre (van den Bogaart *et al.*, 2007 ; Turner *et al.*, 2018). D'autres paramètres, en plus de l'épaisseur, contribuent aux propriétés mécaniques du PG. On peut notamment citer le degré de pontage ou encore la longueur des chaînes de glycane constituant le PG (Vollmer *et al.*, 2008b). On remarque que les cellules en phase stationnaire, comparativement aux cellules en phase de croissance exponentielle, contiennent un peu plus de pontage dans leur PG (notamment plus de pontage de type L-D) et plus de la protéine Lpp (lipoprotéine de Braun) liée au PG. Ces modifications interviendraient dans le renforcement de l'enveloppe et diminueraient l'élasticité du PG (Vollmer & Bertsche 2008). La protéine Lpp est la protéine la plus abondante chez *E. coli* et environ un tiers est ponté au PG permettant une connexion forte entre la membrane externe et le PG (Vollmer & Bertsche 2008).

Les premiers travaux sur la structure du PG avaient estimé le rayon moyen des pores formés dans la structure du PG de *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* à 2.5 nm (Hughes *et al.*, 1975). Une étude ultérieure, réalisée sur des sacculus isolés (de *E. coli* et *B. subtilis*) et se basant sur la diffusion de dextran marquée isotopiquement et de différentes tailles, a permis de confirmer cet ordre de grandeur des pores (2,06 nm pour *E. coli*, 2,12 nm pour *B. subtilis*) (Demchick & Koch, 1996). Sur base de ces valeurs, on estime que de petites protéines hydrophiles et globulaires peuvent diffuser librement dans ces pores. Des protéines globulaires de l'ordre de 50 kDa pourraient également passer en étirant la structure des pores (Demchick & Koch 1996). Un modèle suggère, pour les γ-protéobactéries tel *E. coli*, que le rythme de synthèse du PG serait, entre autres, couplé au rythme de croissance via la taille des pores du PG. En effet, la taille des pores du PG contrôlerait l'accès des régulateurs de la membrane externe ciblant les enzymes de synthèse du PG situées dans la membrane cytoplasmique (voir point 1.2.2.3.6) (Typas *et al.*, 2010).

1.1.3 Biosynthèse du Peptidoglycane

À l'exception des quelques variations, reflétées par les différences de composition du PG, le mécanisme global de biosynthèse du PG est conservé. La synthèse biosynthèse du PG implique de nombreuses réactions s'opérant dans les trois compartiments cellulaires de la bactérie : le cytoplasme, la membrane cytoplasmique et le périplasme. Au sein de ces compartiments s'effectuent respectivement : la synthèse des précurseurs solubles, leur transfert sur un transporteur lipidique au niveau de face interne de la membrane cytoplasmique, le transport des précurseurs du PG toujours liés au transporteur lipidique sur la face périplasmique de la membrane cytoplasmique et la polymérisation de ces précurseurs réalisée dans le périplasme. La description de la biosynthèse du PG est reprise dans les paragraphes suivants avec comme modèle la biosynthèse du PG chez *E. coli*.

1.1.3.1 Phase cytoplasmique : biosynthèse des précurseurs solubles

Les premières étapes de la biosynthèse du PG ont lieu dans le cytoplasme et impliquent plusieurs enzymes pour aboutir à la biosynthèse des précurseurs du PG : l'uridine diphosphate-*N*-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) et l'uridine-diphosphate-*N*-acétylmuramique-pentapeptide (UDP-MurNAc-pentapeptide) (**Figure 1.5**). Au cours de cette voie métabolique, on peut distinguer quatre étapes cruciales : la formation de

l'UDP-MurNAc, la formation de l'UDP-GlcNAc, la formation du D-Ala et du D-Glu et la formation de l'UDP-MurNAc-pentapeptide (Barreteau *et al.*, 2008).

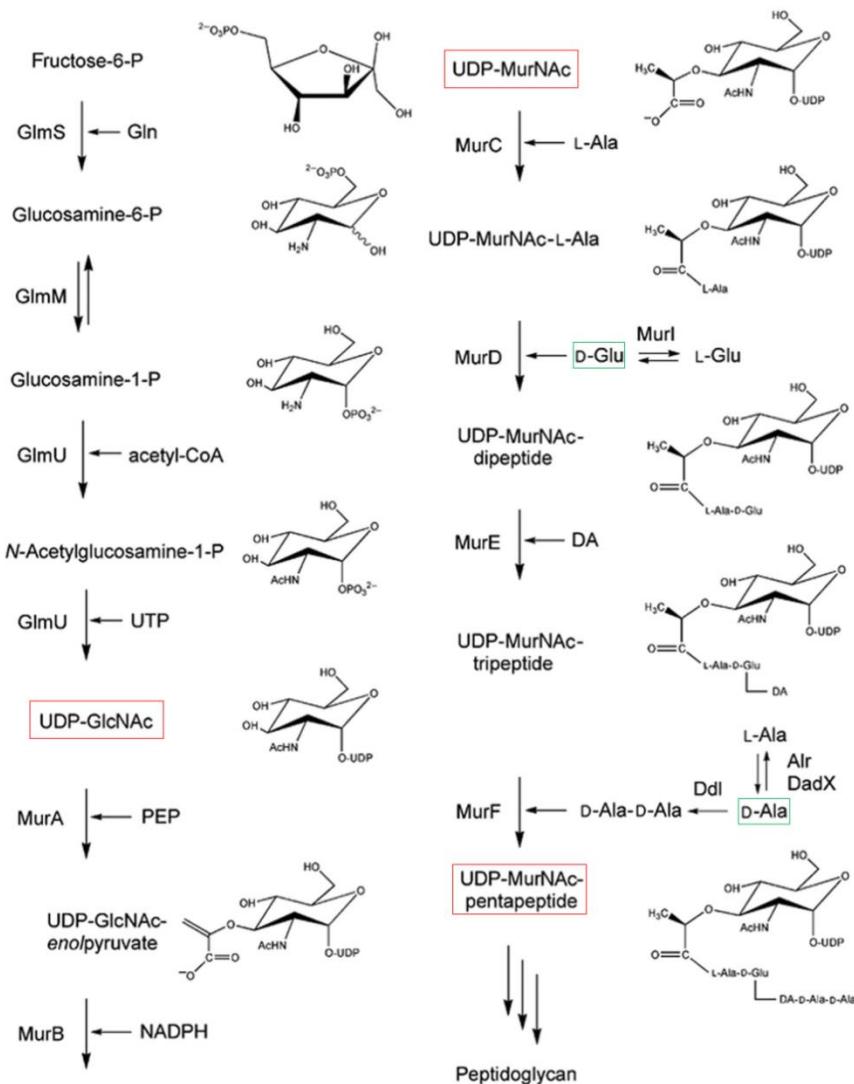


Figure I.5 : Illustration des étapes de la phase cytoplasmique de biosynthèse du PG chez *E. coli*.

Les deux dérivés glucidiques (UDP-GlcNAc et UDP-MurNAc) et le précurseur soluble final (UDP-MurNAc-pentapeptide) de la biosynthèse du PG sont encadrés en rouge, les deux acides aminés de configuration D (D-Glu et D-Ala) sont encadrés en vert (Barreteau *et al.*, 2008). Gln : glutamine ; PEP : phosphoenolpyruvate ; DA : acide diaminé (ex : mDAP).

1.1.3.2 Phase membranaire : synthèse du précurseur membranaire du PG

Cette phase implique le transfert de l'UDP-MurNAc-pentapeptide sur un lipide membranaire appelé l'undécaprényle phosphate ou bactoprénol, un lipide à 55 carbones porteur d'un groupement phosphate (C55-P) pour former le Lipide I. Ensuite, l'UDP-GlcNAc est ajouté au Lipide I pour former le Lipide II qui sera transféré vers l'espace périplasmique (**Figure I.6**). Il faut aussi noter que l'undécaprényle phosphate est le transporteur lipidique central dans le métabolisme des composants saccharidiques de la paroi

bactérienne et est notamment impliqué dans la synthèse des LPS, des acides téichoïques et de la capsule retrouvés chez certaines bactéries.

1.1.3.2.1 Synthèse de l'undécaprényle phosphate

La formation du transporteur lipidique commence par la condensation de huit unités isopentyle (C5) sur le farnesyle pyrophosphate (C15) catalysé par l'undécaprényle pyrophosphate synthétase (UppS) et aboutissant à la formation de l'undécaprényle pyrophosphate (C55-PP) (Ogura et Koyama, 2008). Le C55-PP doit ensuite être déphosphorylé avant de pouvoir charger notamment le précurseur UDP-MurNAc-peptide. Cette déphosphorylation est catalysée par des protéines membranaires appartenant à deux familles différentes d'undécaprényle pyrophosphate phosphatases : la famille BacA et la famille PAP2 (El Ghachi *et al.*, 2004). Chez *E. coli*, les protéines impliquées dans ce processus sont : l'UppP appartenant à la famille BacA et, au moins, deux membres de la famille PAP2 : les enzymes YbjG et PgpB (El Ghachi *et al.*, 2005).

1.1.3.2.2 Synthèse du Lipide I et du Lipide II

Le premier intermédiaire membranaire contenant un précurseur du PG est appelé le Lipide I. Ce dernier est formé par le transfert du phospho-MurNAc-pentapeptide depuis l'UDP-MurNAc-pentapeptide sur le C55-P et le relargage concomitant de l'UMP (Anderson *et al.*, 1965 ; Bouhss *et al.*, 2008). Chez *E. coli*, le nombre de molécules de Lipide I par cellule a été estimé à 700, soit un nombre assez limité (van Heijenoort *et al.*, 1992). La réaction de formation du Lipide I est catalysée par la phospho-MurNAc-pentapeptide translocase nommée MraY, une enzyme formée de dix hélices α transmembranaires (van Heijenoort, 2001b ; Bugg *et al.*, 2006 ; Chung *et al.*, 2013 ; Liu *et al.*, 2016 ; Al-dabbagh *et al.*, 2016 ; Chung *et al.*, 2013 ; Bugg *et al.*, 2006).

Le deuxième intermédiaire membranaire, et précurseur final de la polymérisation du PG, est le Lipide II (**structure annexe 1**). Ce dernier est formé par le transfert du GlcNAc, à partir de l'UDP-GlcNAc, sur l'hydroxyle en C4 du MurNAc du Lipide I avec formation de la liaison β ,1-4 entre les deux sucres. Cette réaction est catalysée par MurG, une glycosyltransférase de la superfamille GT-B (Bouhss *et al.*, 2008).

1.1.3.2.3 Transport du Lipide II : activité flippase

Une fois le Lipide II synthétisé, au niveau du feuillet interne de la membrane cytoplasmique, il doit accéder à la face périplasmique de cette membrane afin d'être utilisé par les enzymes impliqués dans la biosynthèse finale du PG. Il a d'abord été démontré que le processus de translocation du Lipide II ne nécessitait pas d'énergie, mais devrait bien être facilité par une protéine (Dam *et al.*, 2007). Néanmoins, l'identité de la flippase du Lipide II a été, et est toujours, controversée bien que la situation s'est nettement éclaircie (**Figure I.6**).

Sur base de leur topologie prédite, RodA et FtsW, avaient été proposés il y a longtemps comme potentielle flippase du Lipide II (Höltje, 1998). Par ailleurs, il avait été montré que FtsW, purifié dans des liposomes, était capable de faciliter le transport du Lipide II au travers de la membrane en formant, vraisemblablement, un pore à l'intérieur duquel les résidus Arg145 et Lys153 joueraient un rôle dans la

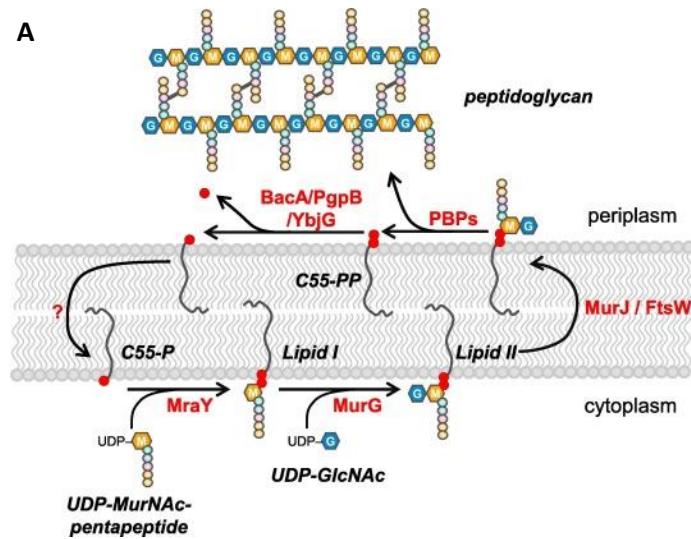
spécificité vis-à-vis du Lipide II (Mohammadi, *et al.*, 2011 ; Mohammadi *et al.*, 2014). Cependant, de multiples résultats récents semblent démontrer que RodA et FtsW seraient en réalité des glycosyltransférases (voir point 1.1.3.3.2) (Cho *et al.*, 2016 ; Taguchi *et al.*, 2019 ; Meeske *et al.*, 2016).

Entre temps, un autre candidat a été proposé pour la fonction de flippase du Lipide II sur base d'une analyse bio-informatique menée chez *E. coli* : MurJ (Ruiz *et al.*, 2008) (**Figure I.6**). Par la suite, de nombreux arguments expérimentaux ont été avancés en faveur de l'activité flippase de MurJ. En effet, MurJ appartient à la superfamille MOP incluant des flippases de substrats similaires au Lipide II et est essentiel chez *E. coli* pour la synthèse du PG (Ruiz, 2008 ; Hvorup *et al.*, 2003). De plus, la délétion de MurJ entraîne une accumulation des précurseurs cytoplasmiques du PG et du Lipide II (Inoue *et al.*, 2008). Par ailleurs, un test flippase *in vivo* chez *E. coli* a pu démontrer que MurJ était capable de transporter le Lipide II avec l'identification de résidus cruciaux pour cette activité (Sham *et al.*, 2015). En outre, une structure cristallographique de MurJ montre une cavité avec un large « patch » hydrophobe formée par les deux hélices α C-terminales (TM13 et 14) et pouvant accommoder le Lipide II (Kuk *et al.*, 2016 ; Zheng *et al.*, 2018). De plus, différentes conformations de MurJ ont pu être capturées, permettant d'élaborer un modèle décrivant son activité de flippase (**Figure I.6**) (Kuk *et al.*, 2019 ; Kumar *et al.*, 2019). Par ailleurs, il a été montré que la cardiolipine serait associée fortement à MurJ et que ce lipide jouerait un rôle régulateur pour la liaison (ou le relargage) du Lipide II lié à MurJ. En effet, la cardiolipine réduirait l'affinité du Lipide II pour MurJ (Bolla *et al.*, 2018).

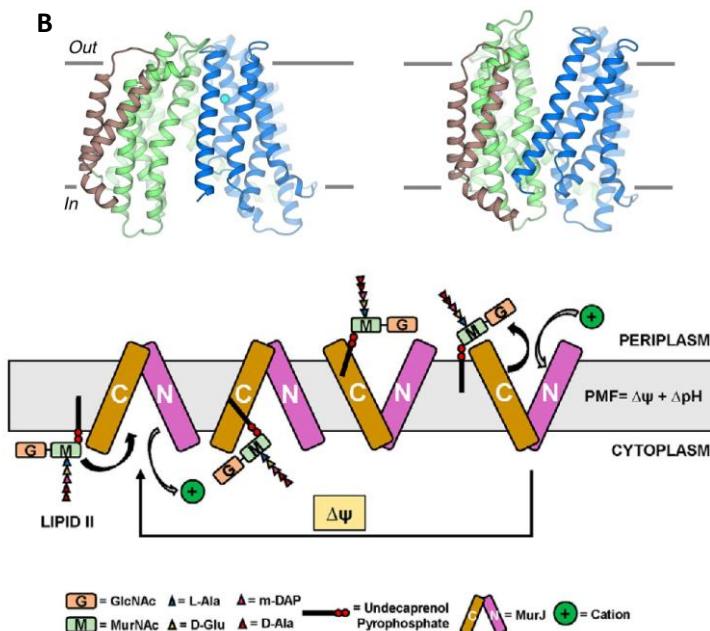
Chez l'organisme modèle des bactéries à Gram positif *B. subtilis*, on retrouve également dix membres de la superfamille MOP similaire à MurJ. Cependant, la délétion de ces dix MOPs n'a pas d'effet significatif sur la croissance de la bactérie (Meeske *et al.*, 2015). Par ailleurs, une étude a permis l'identification de la protéine AmJ comme potentielle flippase (Meeske *et al.*, 2015). Cette protéine est composée de six hélices α transmembranaires et ne possèdent aucune similarité avec MurJ ou d'autres flippases connues (Meeske *et al.*, 2015). Parmi les MOPs de *Bacillus*, *YtgP* est le seul gène qui, couplé à la délétion de *amj* (*ydaH*) est létale pour la cellule : *YtgP* a été renommé *MurJ_{BS}* et est homologue au MurJ d'*E. coli* (Meeske *et al.*, 2015). De manière surprenante, Amj et *MurJ_{BS}* peuvent tous deux compléter l'absence de MurJ chez *E. coli* et sont tous deux capables de transporter le Lipide II *in vivo* (Meeske *et al.*, 2015). Dès lors, le scénario le plus probable est que *MurJ_{BS}* et Amj sont deux flippases du Lipide II (Meeske *et al.*, 2015). Amj jouerait le rôle de flippase alternative en étant sous le contrôle du facteur de stress σ^M (Meeske *et al.*, 2015).

Chez *Helicobacter pylori*, MurJ n'est pas essentiel, mais la double délétion *wzk/murj* est létale pour la bactérie (Elhenawy *et al.*, 2016). WzK code pour un ABC-transporteur impliqué dans la synthèse des LPS. Etonnamment, WzK complémente l'absence de MurJ chez *E. coli* et le domaine ATPase de WzK est essentiel (Elhenawy *et al.*, 2016). Dès lors, il semblerait que WzK soit une flippase de moindre spécificité pouvant transporter les lipides liant des sucres sans grande spécificité.

Ces différentes observations posent d'une part, la question de la redondance des flippases chez les bactéries, et d'autre part, l'identification des éléments dans la reconnaissance du substrat et la spécificité des flippases vis-à-vis de leur substrat, et en particulier pour le Lipide II.



(Hernández-Rocamora et al., 2018)



(Kuk et al., 2019 ; Kumar et al., 2019).

Figure I.6 : Métabolisme et transport du Lipide II.

A. Le Lipide II, une fois synthétisé au niveau de la face interne, est transporté sur la face périplasmique de la membrane cytoplasmique, probablement grâce à MurJ. Le Lipide II est alors utilisé par les enzymes de la biosynthèse finale du PG dont font partie les PBPs (voir texte ci-après). Le transporteur lipidique C55-PP est alors déphosphorylé par une phosphatase spécifique (ex. : BacA) puis basculer vers le cytoplasme avant de pouvoir recharger l'UDP-MurNAc-pentapeptide.

B. Structure du MurJ dans les deux conformations (ouverte vers le cytoplasme et vers le périplasme). Le modèle du transport du Lipide II est illustré en bas de la figure et est le suivant : Le Lipide II nouvellement synthétisé du côté cytoplasmique lie MurJ dans la conformation ouverte vers l'intérieur déstabilisant ainsi cette conformation et initiant la transition vers la conformation ouverte vers l'extérieur. Dans cette conformation, MurJ libère le Lipide II du côté périplasmique. Le potentiel de membrane ($\Delta\Psi$) est requis pour l'activité de MurJ, car il réinitialise MurJ de la conformation ouverte vers l'extérieur à la conformation ouverte vers l'intérieur. Cet effet du potentiel de membrane est probablement accompli par la liaison d'un cation (sphère verte) à un site non caractérisé sur MurJ. Une fois que MurJ est dans la conformation ouverte vers l'intérieur, le cation est libéré de sorte qu'une nouvelle molécule de Lipide II peut se lier à MurJ (Kuk et al., 2019 ; Kumar et al., 2019).

1.1.3.3 Phase périplasmique : polymérisation du PG

Une fois sur la face périplasmique de la membrane cytoplasmique, le Lipide II est utilisé comme substrat des enzymes impliqués dans la biosynthèse du PG. Dans un premier temps, les unités disaccharidiques du Lipide II sont polymérisées pour former les chaînes de glycane par transglycosylation et l'undécaprényle est restitué sous forme C55-PP et devra être re-déphosphorylé pour pouvoir recharger un disaccharide-peptide (Bouhss et al., 2008). Dans un second temps, les chaînes de glycane voisines seront pontées par l'activité transpeptidase des « Penicillin-Binding Proteins » ou PBPs. Ces derniers ont la capacité d'être inactivés par les β -lactamines telle que la pénicilline en formant un adduit covalent avec ceux-ci (Tipper & Strominger, 1965).

1.1.3.3.1 Les PBPs ou « Penicillin-Binding Proteins »

Les PBPs, au nombre de douze chez *E. coli*, sont des enzymes de la famille des acyle-sérine transférases et possèdent un domaine catalytique comprenant une sérine active responsable de la catalyse. Leur nom provient du fait qu'elles sont capables de lier covalentiellement les antibiotiques de type β -lactamine mimant le substrat D-Ala-D-Ala, mais qui agissent comme substrats suicides pour l'enzyme, l'inactivant ainsi pendant une longue durée et engendrant la mort de la bactérie par lyse cellulaire. (Tipper & Strominger, 1965 ; Ghuyzen, 1991 ; Sauvage *et al.*, 2008). On distingue deux grands groupes de PBPs : Les PBPs de haut masse moléculaire (HMW) et les PBPs de faible masse moléculaire (LMW) (Sauvage *et al.*, 2008). Les PBPs HMW sont les PBPs responsables de la polymérisation du PG naissant et de son insertion au PG préexistant (Goffin & Ghuyzen, 1998 ; Born *et al.*, 2006). Leur structure comprend généralement une courte portion cytoplasmique, un segment transmembranaire, un domaine N-terminal, un domaine « linker » et enfin le domaine C-terminal transpeptidase (TPase) pouvant lier la pénicilline (Sauvage *et al.*, 2008). Les PBPs HMW sont divisés en deux sous-classes : les PBPs de classe A (aPBPs) et les PBPs de classe B (bPBPs).

Les premiers, possédant un domaine N-terminal glycosyltransférase (GTase), sont représentés par trois membres chez *E. coli* : PBP1a, PBP1b et PBP1c. Le rôle exact du PBP1c n'est pas encore bien compris, sa surproduction ne complémentant pas la double délétion PBP1a/PBP1b (Schiffer & Holtje, 1999). Parmi les PBPs de classe A, PBP1a et PBP1b sont les deux plus importants et possèdent toutes deux un domaine non catalytique supplémentaire (ODD pour PBP1a et UB2H pour PBP1b) important pour la régulation de leur activité (point 1.2.2.3.6) (Typas *et al.*, 2010). *E. coli* peut survivre en l'absence du PBP1a ou du PBP1b, mais une double délétion est létale pour la cellule (Yousif *et al.*, 1985 ; Kato *et al.*, 1985). Néanmoins, le PBP1a est préférentiellement associé à la biosynthèse du PG durant la phase d'élongation de la bactérie alors que le PBP1b est associé à la biosynthèse du PG lors de la division appelé PG septal (sPG) : il y a donc une semi-redondance de ces deux protéines (Garcia del Portillo & Pedro 1990, 1991 ; Pepper *et al.*, 2006 ; Ranjit & Young 2013).

Chez les bPBPs, on retrouve un domaine N-terminal qui serait impliqué dans les interactions avec d'autres partenaires protéiques et qui est indispensable pour une bonne morphogénèse de la bactérie (Holtje, 1998 ; den Blaauwen *et al.*, 2008 ; Zapun *et al.*, 2008a). On retrouve deux bPBPs chez *E. coli* : le PBP2 est impliqué dans le complexe d'élongation appelé élongosome ou « Rod complex » alors que PBP3 est une protéine essentielle à la division associée au complexe appelé divisome (voir point 1.2) (Spratt, 1975, den Blaauwen *et al.*, 2008).

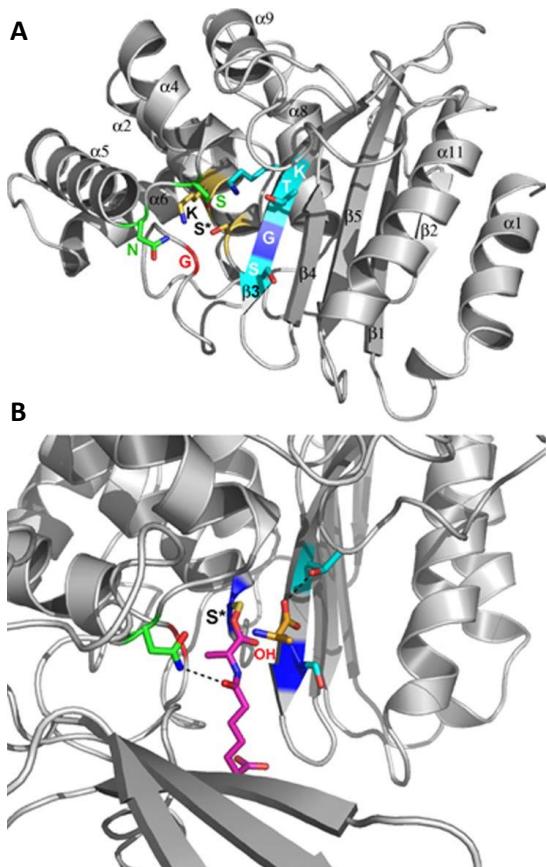
Les LMW PBPs, également appelés PBPs de classe C, sont impliqués dans la maturation du PG et son recyclage : ils sont au nombre de sept chez *E. coli*. Ces PBPs sont individuellement non essentiels et seule la délétion de plusieurs de ces PBPs engendre des défauts morphologiques (Denome *et al.*, 1999). Ceci est notamment expliqué par leur redondance en termes d'activité enzymatique. PBP4 et PBP7 sont deux endopeptidases clivant les pontages inter-peptidiques du PG (voir détail 1.1.4.2) (Vollmer *et al.*, 2008c). On retrouve également le PBP5 en grande quantité, il s'agit de la DD-carboxypeptidase majeure d'*E. coli* clivant la D-Ala en position 5 du pentapeptide et rendant ce peptide incapable de jouer le rôle de substrat donneur dans la réaction de transpeptidation. Ainsi le PBP5 régule le degré de pontage du PG (Spratt & Strominger, 1976). PBP5 est crucial au maintien de la forme de la bactérie (Denome *et al.*, 1999). Les PBP6 et PBP6b sont également des DD-carboxypeptidases comme PBP5. Finalement, on trouve la DD-carboxypeptidase PBP4b et AmpH qui présentent les activités DD-endopeptidase et DD-carboxypeptidase. Cette dernière possède également une certaine activité β -lactamase, c'est-à-dire qu'elle est capable de dégrader les β -lactamines (González-Leiza *et al.*, 2011).

Le nombre et le type de PBPs présents chez les différentes bactéries sont variables et dépendent de nombreux facteurs tels la forme de la bactérie, ou encore des particularités du cycle de vie de la bactérie. Par exemple, chez les coques tel que *Neisseria gonorrhoeae* qui ne possède pas d'élongosome on retrouve juste l'homologue de PBP3 et seulement quatre PBPs au total (Sauvage *et al.*, 2008). L'organisme modèle des bactéries à Gram positif *B. subtilis* possède seize PBPs. On retrouve notamment un PBP5* homologue au PBP5 d'*E. coli* et qui est essentiel pour la bonne formation des spores chez cette bactérie. Il est également intéressant de mentionner que chez les entérocoques on retrouve trois aPBPs et trois bPBPs (Arbeloa *et al.*, 2004). Chez ce genre bactérien, un des bPBPs, comme le PBP5 chez *E. faecium*, est responsable de la résistance aux β -lactamines chez cette espèce (Duez *et al.*, 2001a ; Zapun *et al.*, 2008b). En effet, ce PBP possède une affinité faible pour les β -lactamines et est capable de prendre le relais des autres PBPs lorsque ceux-ci sont inhibés par les β -lactamines présentes dans le milieu extérieur (Gagetti, P. *et al.*, 2019).

1.1.3.3.1.1 Le domaine acyl-sérine transférase des PBPs

Les différents PBPs ont pour point commun leur activité DD-peptidase portée par le domaine acyl-sérine transférase caractéristique : le PB domaine. Ce dernier est constitué de deux sous-domaines : un domaine avec un feutre β à cinq brins couverts par trois hélices α et un domaine constitué uniquement d'hélices α (**Figure I.7**). Le site actif est situé à l'interface entre ces deux domaines et comprend neuf résidus conservés dont la sérine active (Goffin & Ghysen, 1998). Cette dernière est positionnée au début de l'hélice α 2 et est suivie d'une lysine pour former le motif 1 S*xxK. On retrouve un second motif SxN, situé dans une boucle entre les hélices α 4 et α 5. Le troisième motif KTG(T/S) et une glycine retrouvée à l'arrière du site actif sont également strictement conservés (**Figure I.7**) (Goffin & Ghysen, 1998).

La réaction de transpeptidation permet le pontage entre deux peptides portés par des chaînes de glycanes adjacentes. Cette réaction nécessite un pentapeptide donneur qui va perdre la D-Ala en position 5 durant la réaction et un accepteur pouvant être le tri-, tétra- ou pentapeptide. Dans un premier temps, le groupement hydroxyle de la sérine active de la transpeptidase réagit avec le groupement carboxyle de la D-Ala en position 4 pour former le complexe covalent acyle-enzyme (Sauvage *et al.*, 2008). Durant ce processus, la D-Ala en position 5 du donneur est clivée. Dans un second temps, une attaque nucléophile par le groupement amine γ de l'acide diaminé en position 3 de l'accepteur, sur le carbonyle de l'acyle-enzyme permet de former une liaison peptidique et le pontage des chaînes de glycane (Sauvage *et al.*, 2008).

**Figure I.7 : Structure et site actif du domaine PBP.**

A. Domaine PB (*PBP4 B. subtilis*). Les régions colorées mettent en évidence les motifs conservés dans cette famille d'enzyme : le motif SxxK en jaune, le motif SxN en vert et le motif KTG/(S/T) en bleu.

B. Détails du site actif où la sérine active est acylée par un peptide mimant celui du PG. Le départ de l'alanine C-terminale est montré en orange.

(Sauvage *et al.*, 2008).

1.1.3.3.2 Domaine glycosyl-transférase et famille SEDS

Le domaine glycosyltransférase ou transglycosylase (GTase) occupe généralement la partie N-terminale des aPBPs mais existe également sous forme de domaine isolé (GTase monofonctionnelle) chez certaine bactéries (MtgA chez *E. coli* ou *S. aureus*). Il est responsable de l'assemblage des unités « disaccharide-peptide » portées par le Lipide II pour former les chaînes de glycane du PG non pontées. Ces enzymes appartiennent à la famille GT51 dans la classification des GTases selon la base de données CAZy (www.cazy.org). Le domaine glycosyltransférase, que ce soit celui des aPBPs ou de la MtgA, est formé presque exclusivement d'hélices α et à une structure proche de celle du lysozyme (Lovering *et al.*, 2007 ; Yuan *et al.*, 2007). Tout comme dans le lysozyme, on retrouve deux sous domaines : un grand et un petit lobe séparés par un sillon contenant le site actif (Sauvage *et al.*, 2008). Une caractéristique du domaine GTase est la présence d'une région hydrophobe importante pour l'interaction avec la membrane et le Lipide II (Sauvage *et al.*, 2008).

Le site actif est divisé en deux parties : un site donneur et un site accepteur recevant respectivement le substrat donneur (la chaîne de glycane en croissance) et le substrat accepteur (une molécule de Lipide II) (**Figure I.8**). La moénomycine, un antibiotique de type phosphoglycolipide, se lie au site donneur de ces enzymes et bloque leur activité GTase (Welzel, 2005). On retrouve cinq motifs conservés dont les trois premiers se retrouvent dans la poche catalytique (Terrak *et al.*, 1999, 2008) (**Figure I.8**). Dans le motif 1 (EDxxFxxHxG) et le motif 3 (RKxxE) on retrouve les deux résidus glutamates conservés dont celui du motif 1 qui est essentiel à la catalyse (Terrak *et al.*, 1999). Le motif 2 (GxSTxxQQxxK) divise la poche catalytique en deux sous-poches et semble impliquée dans la reconnaissance du substrat (Sauvage *et al.*, 2008). Les motifs 4 (KxxYxxYxN) et 5 (RxxxxL) semblent jouer un rôle structural (Lovering *et al.*, 2007). L'elongation des chaînes de glycane s'effectue par attaques successives de la chaîne de glycane en

croissance (donneur), au niveau de son extrémité réductrice, par le Lipide II (accepteur). Le glutamate du motif 1 (E233 chez le PBP1b d'*E. coli*) catalyse la déprotonation de l'extrémité 4-OH du GlucNAc permettant une attaque nucléophile sur le carbone anomérique en C1 de la chaîne de glycane en croissance et la formation d'une nouvelle liaison β -1,4 entre les sous-unités MurNAc-GlcNAc avec une inversion de configuration au niveau du C1 (**Figure I.8**). Simultanément, le glutamate du motif 3 (E290 chez le PBP1b d'*E. coli*) stabiliserait le groupement partant C55-PP, probablement avec l'aide d'un cation divalent (Terrak *et al.*, 1999 ; Lovering *et al.*, 2007 ; Schwartz *et al.*, 2002) (**Figure I.8**).

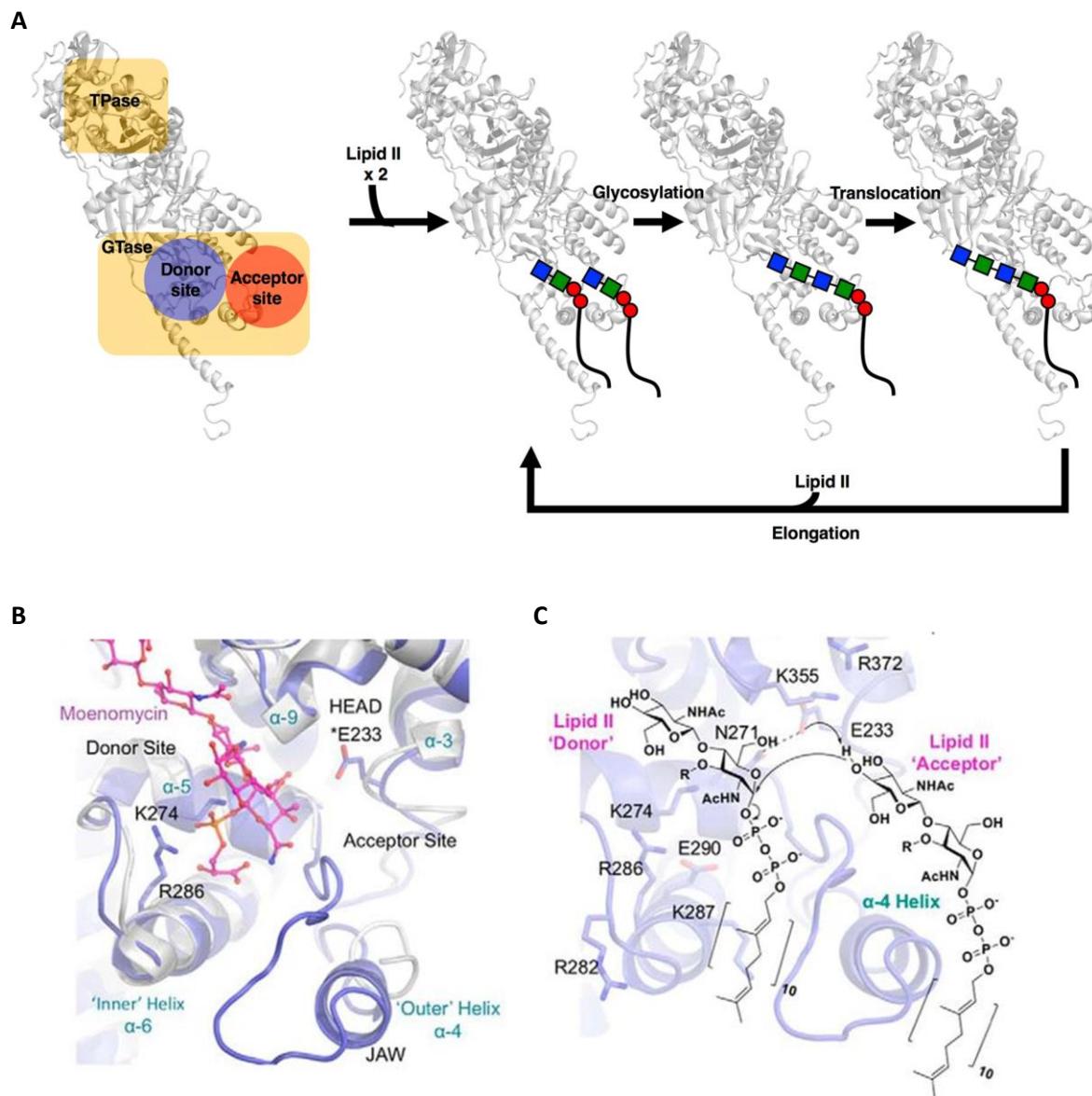


Figure I.8 : Structure du site actif du PBP1b complexé par la moénomycine et mécanisme catalytique proposé pour la réaction de transglycosylation.

- Vue générale du mécanisme d'élargissement des chaînes de glycanes par le PBP1b à partir du Lipide II (Kim *et al.*, 2018).
- Dans cette structure du PBP1b, la moénomycine se lie au site donneur du domaine GTase.
- Modélisation des deux Lipides II occupant les sites donneur et accepteur au début du cycle de la réaction de transglycosylation (King *et al.*, 2016).

Récemment, une nouvelle famille de GTase a été définie : la famille SEDS (Figure I.9) (« Shape, Elongation, Division and Sporulation ») à laquelle appartiennent les protéines membranaires RodA et FtsW. Il a été démontré pour la première fois *in vitro* que la protéine RodA de *B. subtilis* possède une activité glycosyltransférase et que la surexpression de RodA permet au mutant, dépourvu de l'ensemble de ses PBPs de classe A (aPBPs), de survivre (Meeske *et al.*, 2016 ; Emami *et al.*, 2017). La contribution de RodA à la synthèse du PG a été également démontré chez *E. coli* *in vivo* (voir point 1.2.1) (Cho *et al.*, 2016). Contrairement à RodA qui montre une faible activité GTase seule *in vitro*, FtsW a besoin d'interagir avec son PBP de classe B partenaire (voir point 1.2.2.3.5) pour être actif (Meeske *et al.*, 2016 ; Taguchi *et al.*, 2018). Néanmoins il a été suggéré que le PBP2, le partenaire de RodA, pourrait stimuler son activité GTase (Taguchi *et al.*, 2018). Enfin, il a été montré que le FtsW de *S. aureus*, en présence de son PBP partenaire de classe B (PBP1) allonge les chaînes de glycane de la même manière que les PBPs de classe A, c'est-à-dire par ajout d'unités disaccharidiques à l'extrémité réductrice de la chaîne de glycane en croissance (Welsh *et al.*, 2019). Néanmoins, l'activité GTase des SEDS n'est pas inhibée par la moénomycine (Meeske *et al.*, 2016 ; Taguchi *et al.*, 2018).

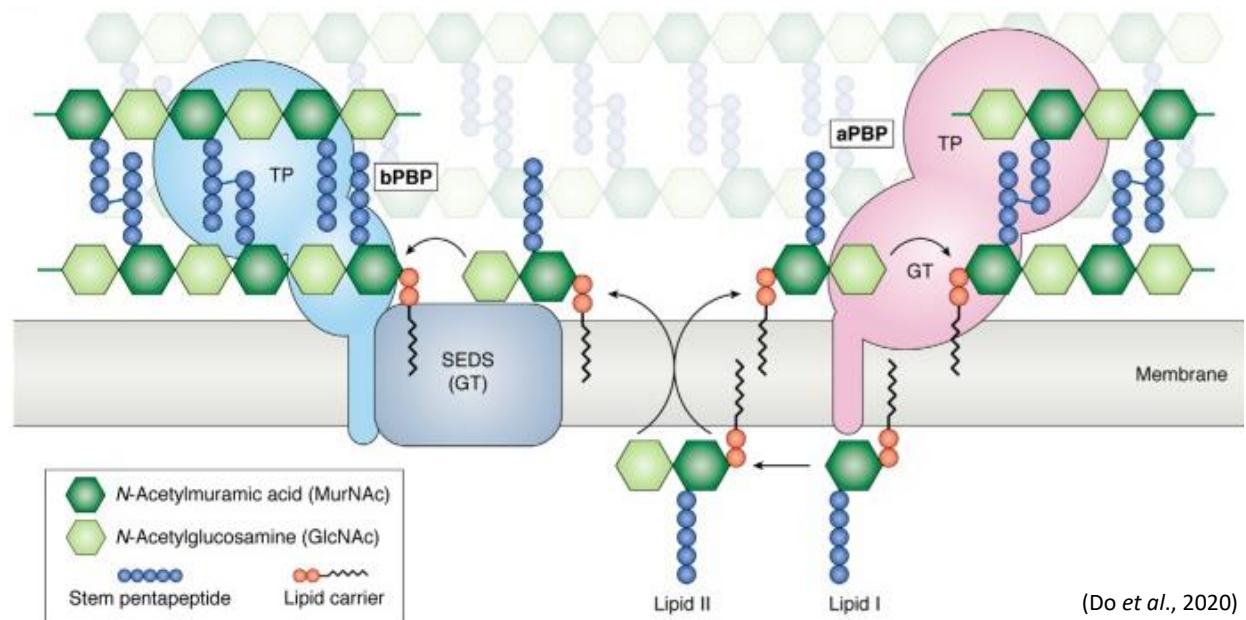


Figure I.9 : Modèle de biosynthèse du PG par les aPBPs et le couple SEDS/bPBP.

Voir détails dans le texte. GT : activité transglycosylase ; TP : activité transpeptidase.

1.1.4 Remodelage du PG : les hydrolases

Le peptidoglycane est une structure dynamique en continu remaniement. Ces remodelages sont essentiels notamment pour la croissance du sacculus afin de permettre : l'incorporation de nouveau matériel, la séparation des deux cellules filles, la formation, la maturation et la germination des spores ou encore la formation de biofilm (Vollmer *et al.*, 2008c). En particulier, il avait été suggéré que des complexes multiprotéiques, contenant les enzymes de synthèse du PG et les hydrolases, fonctionnaient ensemble (voir point 1.2) pour agrandir le sacculus selon le « modèle 3 pour 1 ». Dans cette conception, trois nouvelles chaînes de glycanes pontées sont incorporées dans le PG, par transpeptidation, grâce à la dégradation d'une chaîne de glycane déjà présente dans le PG (Holtje, 1998). Ce modèle a pu ensuite être corroboré expérimentalement avec du PG radioactivement marqué : 30 % du PG nouvellement synthétisé est en effet dégradé durant la division (Uehara & Park, 2008). Différentes classes d'enzymes interviennent dans le processus de remodelage en clivant le PG tant dans sa partie saccharidique que dans sa partie peptidique. La plupart des bactéries possèdent un grand nombre d'hydrolases semblant, pour certaines, avoir des rôles redondants. De plus, une même hydrolase peut assurer plusieurs fonctions et activités spécifiques (Holtje & Tuomanen, 1991 ; Smith *et al.*, 2000). Ces hydrolases exercent généralement leur activité dans le périplasme et sont solubles. Néanmoins, certaines sont cytoplasmiques, sécrétées, des lipoprotéines ou encore en interaction avec la membrane (Vollmer *et al.*, 2008c). Il est évident que les hydrolases doivent être hautement régulées afin de préserver un équilibre entre biosynthèse et dégradation du PG. Les mécanismes de régulation sont multiples : un contrôle transcriptionnel, une régulation de la localisation des hydrolases, la dégradation protéolytique des hydrolases, les interactions avec d'autres partenaires protéiques modulant l'activité hydrolytique, les adaptateurs tel NlpI qui associent des enzymes de synthèse du PG et des hydrolases, le pH, ect (Holtje & Tomasz, 1975 ; Cleveland *et al.*, 1976 ; Fischer *et al.*, 1981 ; Heidrich *et al.*, 2001 ; Bernhardt & de Boer, 2003 ; Vollmer *et al.*, 2008c ; Banzhaf *et al.*, 2020). Cependant, dans des conditions de stress, une lyse programmée où l'hydrolyse du PG prend le pas sur la synthèse, touchant une partie de la population bactérienne, peut se dérouler et être bénéfique pour la communauté bactérienne (Rice & Bayles, 2003).

La spécificité de ces hydrolases est illustrée dans la **Figure I.10**. Parmi ces hydrolases on retrouve des enzymes clivant dans la partie peptidique du PG : les DD-carboxypeptidases (ou LD-carboxypeptidases) clivant le dernier acide aminé du peptide et les endopeptidases (LD ou DD) clivant entre les différents acides aminés au sein du peptide (Vollmer *et al.*, 2008c). On retrouve également les amidases (*N*-acétylmuramyl-L-alanine amidases) clivant la liaison amide entre le MurNAc et la L-Ala. Enfin, on peut citer trois types d'hydrolases clivant les chaînes de glycane : Les *N*-acetylglucosaminidases et les muramidases comprenant les lysozymes et les transglycosylases lytiques (Vollmer *et al.*, 2008c).

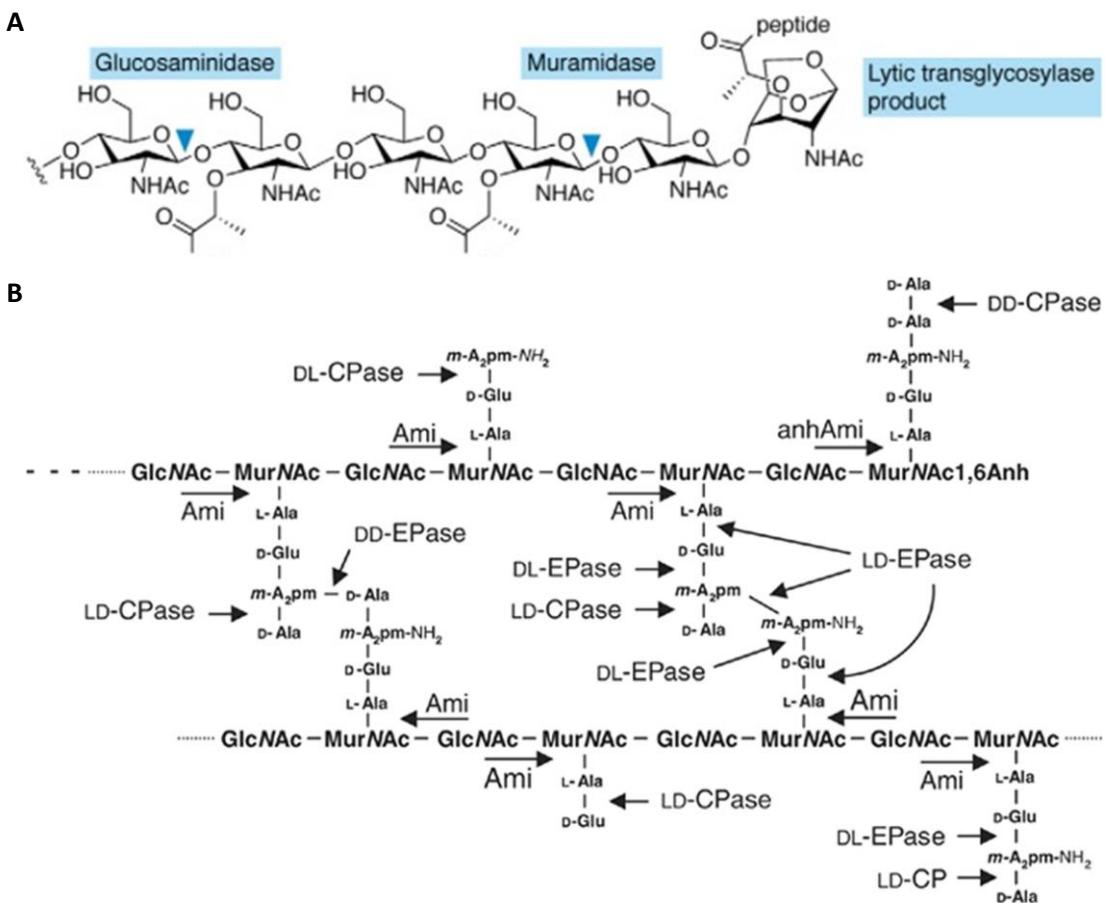


Figure I.10 : Récapitulatif des activités hydrolytiques des enzymes impliqués dans le remodelage du PG d' *E. coli*.

- A. Activités glycosidases : sites de clivages des glucosaminidases, des muramidases (lysosomes) et des transglycosylases lytiques sur une chaîne de glycanes (Do *et al.*, 2020).
- B. Activités peptidases : Les *N*-acétylmuramyl-L-alanine amidases (Ami) hydrolysent le lien amide entre le groupement lactyl du MurNAc et la L-Ala. Certaines amidases (anhAmi) clivent spécifiquement le lien au niveau du 1,6-anhydroMurNAc caractéristique du turnover du PG. Le site de clivage des différentes endopeptidases (DD-EPase, LD-EPase, DL-EPase) et carboxypeptidases (DD-CPase, LD-CPase, DL-CPase) sont également repris dans la figure (Vollmer *et al.*, 2008c).

1.1.4.1 Les amidases

Comme décrit précédemment, les amidases permettent d'éliminer le peptide des chaînes de glycane en clivant entre le MurNAc et la L-Ala. Ces enzymes font partie du système autolytique de la bactérie, mais sont également retrouvées chez les phages : on parle d'endolysines (Loessner, 2005). Chez *E. coli*, on retrouve cinq amidases : AmiA, AmiB, AmiC (solubles et périplasmiques), AmiD (lipoprotéine) et AmpD (cytoplasmique) (Jacobs *et al.*, 1995 ; Heidrich *et al.*, 2001 ; Uehara & Park, 2007). On peut former deux groupes sur base de leur séquence : AmiA, AmiB et AmiC d'une part, AmiD et AmpD d'autre part. Le premier groupe sont des métallo-enzymes à Zn⁺⁺ intervenant dans le processus d'hydrolyse partielle du septum et donc dans la séparation des deux cellules filles (Rocaboy *et al.*, 2013). Davantage de détails, notamment quant à la régulation et aux structures de ces protéines, seront présentés dans le point 1.2.2.3.9. L'amidase cytoplasmique AmpD exerce son activité catalytique sur des produits de dégradation du PG et intervient dans le recyclage de ce dernier (Uehara & Park, 2007). En effet AmpD

dégrade le GlcNAc-1,6-anhydroMurNAc-penta, -tetra- et -tripeptide (Holtje *et al.*, 1994 ; Jacobs *et al.*, 1995) (voir point 1.1.4.5). AmiD, au contraire, clive sans différence après le MurNAc ou 1,6-anhydroMurNAc (Uehara & Park, 2007 ; Pennartz *et al.*, 2009). Bien qu'il existe dans le monde bactérien une grande diversité d'amidases, on retrouve généralement chez ces enzymes, en plus du domaine catalytique, un domaine supplémentaire de liaison au PG comme par exemple le domaine AMIN de AmiC (Rocaboy *et al.*, 2013).

1.1.4.2 Endopeptidases et Carboxypeptidases

Les endopeptidases et carboxypeptidases sont les enzymes hydrolysant une liaison amide entre deux acides aminés respectivement au sein de la chaîne polypeptidique ou à partir de l'extrémité C-terminale. Les peptidases du PG ont chacune leur spécificité : on retrouve les DD- LD- ou DL- peptidases selon la configuration des résidus impliqués dans le lien clivé par l'enzyme (Vollmer *et al.*, 2008c).

Les DD-carboxypeptidases, pour la plupart, sont des PBPs de faible masse moléculaire, en l'occurrence des PBPs de type-5 : PBP5, PBP6 et PBP6B chez *E. coli* (Davies *et al.*, 2001 ; Nicholas *et al.*, 2003). Les DD-carboxypeptidases clivent la liaison D-Ala-D-Ala, rendant le peptide non disponible pour la réaction de transpeptidation (Spratt & Strominger, 1976). PBP5 est ancré à la membrane par une hélice α C-terminale amphipathique. Les cellules dépourvues du PBP5 montrent des défauts de morphologie et la délétion conjointe des autres DD-carboxypeptidases rend le phénotype encore plus sévère (Meberg *et al.*, 2004 ; Nelson & Young, 2000 & 2001).

Chez *E. coli*, LdcA est une LD-carboxypeptidase cytoplasmique intervenant dans le recyclage du PG au début de la phase stationnaire (Templin *et al.*, 1999). Cet enzyme est active aussi bien sur les tétrapeptides (L-Ala-D-Glu-*m*DAP-D-Ala) libres ou liés au MurNAc-GlcNAc, ou UDP-MurNAc, mais jamais sur des fragments plus grands ou sur le sacculus entier (Vollmer *et al.*, 2008c). Sur base de la structure d'une LD-carboxypeptidase de *P. aeruginosa*, on a pu identifier la triade catalytique de type Ser-His-Glu relativement rare parmi les séries protéases (Korza & Bochtler, 2005).

Les DD-endopeptidases clivent le lien amide entre le D-Ala et le *m*DAP reliant deux peptides de deux chaînes de glycanes voisines (Vollmer *et al.*, 2008c). Ces enzymes réalisent en quelque sorte l'activité inverse des DD-transpeptidases. D'ailleurs, beaucoup de DD-endopeptidases sont des PBPs de faibles poids moléculaires présentant les motifs typiques des PBPs et sont inhibées par les β -lactamines (Goffin & Ghysen, 1998 ; Sauvage *et al.*, 2008). On retrouve les DD-endopeptidases appartenant aux PBPs de classe C type-4, correspondant au PBP4 chez *E. coli* (Sauvage *et al.*, 2008). Il s'agit d'un PBP multimodulaire (3 domaines) et non ancré dans la membrane cytoplasmique (Sauvage *et al.*, 2008 ; Harris *et al.*, 2002). Le PBP4 serait important pour une croissance correcte du sacculus (Sauvage *et al.*, 2008). D'autres fonctions ont été attribuées aux PBPs de type-4 chez d'autres bactéries comme par exemple la séparation des cellules filles ou encore un rôle dans la formation des biofilms (Gallant *et al.*, 2005 ; Priyadarshini *et al.*, 2006). Un second groupe de DD-endopeptidases est formé des PBPs de classe C apparentés au PBP7 d'*E. coli*. Il faut noter que PBP7 est homologue au PBP5 mais ne possède pas le domaine C-terminal et l'hélice α amphipathique d'ancre à la membrane présentent chez dans le PBP5 (Sauvage *et al.*, 2008). La délétion du PBP7 n'a pas d'impact morphologique sur la bactérie alors que la double délétion Δ PBP5- Δ PBP7 engendre un défaut de morphologie plus sévère que le mutant Δ PBP5 (Meberg *et al.*, 2004). Par ailleurs, il a été démontré *in vitro* que PBP7 stabilise et stimule l'activité de la transglycosylase lytique Slt70 par interaction directe (Romeis & Holtje, 1994).

Il existe également des DD-endopeptidases qui ne sont pas des PBPs comme Spr, YebA et YdhO possédant une stricte activité DD-endopeptidase (Singh *et al.*, 2012 ; Vollmer *et al.*, 2008c) ou encore la protéine MepA d'*E. coli* qui possèdent, en plus, une activité LD-endopeptidase (*mDAP-mDAP*). Cette dernière est une métallo-protéase à Zn⁺⁺ structurellement proche de la lysostaphine clivant dans le pont pentaglycine présent chez *S. aureus* (Heinrich *et al.*, 1987). Chez *B. subtilis*, plusieurs LD-endopeptidases ont été identifiées tels que CwlK et LytH qui hydrolysent la liaison entre la L-Ala et le D-Glu (Fukushima *et al.*, 2007). La seconde est responsable en particulier des MurNAc porteurs uniquement de la L-Ala, retrouvé dans les spores de *B. subtilis* (Horsburgh *et al.*, 2003). Toujours chez *B. subtilis*, on retrouve deux familles de DL-endopeptidases clivant entre le D-Glu et le *mDAP*. La famille II des DL-endopeptidases regroupe CwlS, CwlO, LytE et LytF alors que la famille I comprend YggT, Zn⁺⁺ dépendant, ayant une double activité DL-endopeptidase/DL-carboxypeptidase pouvant cliver à la fois entre le D-Glu et le *mDAP* du tripeptide L-Ala-D-Glu-*mDAP* (DL-carboxypeptidase) ou du tétrapeptide L-Ala-D-Glu-*mDAP*-D-Ala) attaché ou non au MurNAc-GlucNAc (DL-endopeptidase). Chez *E. coli*, on retrouve un membre de cette famille : MpaA (Uehara & Park, 2003). Les LD-carboxypeptidases clivent entre le *mDAP* et le D-Ala d'un tétrapeptide et éliminent la D-Ala terminale. Un exemple de ce type d'enzyme est DacB, retrouvé chez *Lactococcus lactis* (Courtin *et al.*, 2006 ; Vollmer *et al.*, 2008c).

1.1.4.3 Les Muramidases

On distingue deux types de muramidases : les lysozymes et les transglycosylases lytiques. Les premiers clivent le lien β -1,4 et libèrent l'extrémité réductrice du MurNAc. Les secondes hydrolysent ce même lien en catalysant une réaction intramoléculaire qui conduit à la formation du 1,6-anhydroMurNAc (Holtje *et al.*, 1975 ; Vollmer *et al.*, 2008c). Les lysozymes sont produits par de nombreux organismes tels les vertébrés, les invertébrés, les champignons, les phages ou encore les bactéries (Vollmer *et al.*, 2008c). On distingue plusieurs types de lysozymes, agissant sur les chaînes de glycanes du PG, qui ne partagent entre elles que très peu d'identité de séquence mais qui possèdent certaines similarités structurales avec généralement un résidu glutamate, ou deux, essentiels à la catalyse (Strynadka & James, 1996 ; Vollmer *et al.*, 2008c). On peut citer LytC, de *S. pneumoniae*, comme exemple de *N*-acétylmuramidase de type « lysozyme » (Garcia *et al.*, 1999). La réaction catalysée par les transglycosylases lytiques implique un résidu acide, généralement un glutamate donnant son proton à la liaison β -1,4 (Thunnissen *et al.*, 1994). La plupart de ces enzymes agissent à l'extrémité des chaînes de glycane (Vollmer *et al.*, 2008c). Ces enzymes sont classés en quatre familles sur base de leur structure primaire et de la présence d'un motif spécifique, la famille 1 est divisée en cinq sous-familles (de A à E) (Blackburn & Clarke, 2001). Chez *E. coli*, on retrouve : Slt70 (1A), MltC (1B), EmtA (1C), MltD (1D), Yfhd (1E), MltA (famille 2) et MltB générant une forme soluble périplasmique nommée Slt35 (famille 3) (Vollmer *et al.*, 2008c). Slt70 est périplasmique alors que toutes les Mlts et EmtA sont des lipoprotéines (Vollmer *et al.*, 2008c). Enfin, EmtA est la seule transglycosylase lytique d'*E. coli* montrant une activité « endo-spécifique » et qui ne dégrade pas le PG à partir de l'extrémité des chaînes de glycane (Kraft *et al.*, 1998).

1.1.4.4 Les *N*-acétylglucosaminidases

Les *N*-acétylglucosaminidases du PG clivent le lien osidique entre le GlcNAc et le MurNAc (Karamanos, 1997). Ces enzymes, en plus de leur domaine catalytique, présentent un ou plusieurs domaines de liaison aux glycane (ex : LysM, CHAP, SH3...) (Vollmer *et al.*, 2008c). On peut citer AtlA de *Enterococcus faecalis*

présentant six domaines LysM nécessaires pour une activité optimale de cet enzyme (Eckert *et al.*, 2006). Il faut noter que certaines *N*-acétylglucosaminidases présentent une activité « exo ». Chez *E. coli*, c'est le cas de NagZ qui exerce son activité sur le disaccharide GlcNAc- 1,6-anhydroMurNAc-peptide), un intermédiaire de la voie de recyclage du PG (Vötsch & Templin, 2000).

1.1.4.5 Le recyclage du PG

Chez les bactéries à Gram négatif tel *E. coli*, on estime qu'environ 45 % du PG est recyclé à chaque génération (Goodell, 1985). Onze gènes impliqués dans ce processus ont été identifiés chez *E. coli*. Les fragments de PG générés pourront être utilisés pour construire du nouveau PG ou servir de source d'énergie, suivant les besoins de la bactérie (Uehara & Park, 2008). Les processus hydrolytiques se déroulant dans le périplasme génèrent des fragments de type GlcNAc-anhMurNAc-tri-, tétra-, et pentapeptide avec une dominance de tétra (Shockman & Holtje, 1994). Les anhydro-muropeptides passent dans le cytoplasme par l'intermédiaire de la perméase AmpG, spécifique du GlcNAc-anhMurNAc (Cheng & Park, 2002). En bref, l'action de l'amidase AmpD et de la LD-carboxypeptidase LdcA génère le tripeptide qui est pris en charge par Mpl pour être transféré à l'UDP-MurNAc. Le tripeptide réintègre aussi la voie de biosynthèse du PG (Uehara & Park, 2008). Alternativement, le tripeptide peut être clivé pour libérer les trois acides aminés (environ 10 % en phase de croissance) grâce à l'action successive de MpaA, YcjG et PepD (Uehara & Park, 2008). Le GlcNAc-anhMurNAc libéré, par l'action de AmpD, va être métabolisé par une série d'enzymes dont la *N*-acétylglucosaminidases NagZ, cité ci-dessus, pour *in fine* soit alimenter la glycolyse soit régénérer l'UDP-GlcNAc qui pourra entrer à nouveau dans la voie de synthèse cytoplasmique du PG ou encore des LPS (**Figure I.11**) (Uehara & Park, 2008).

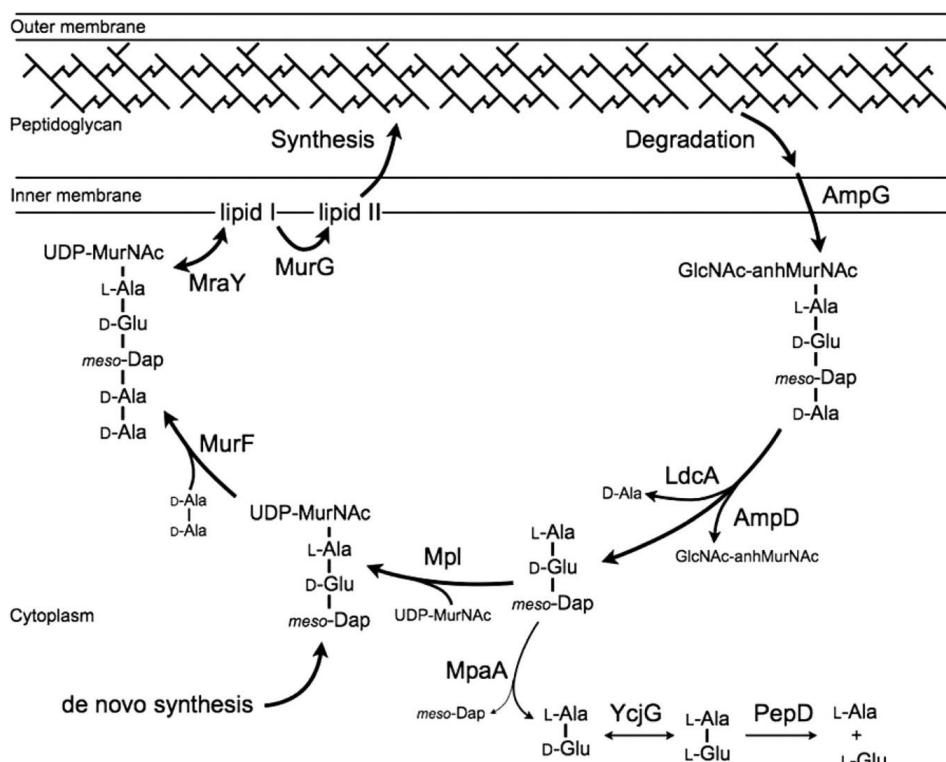


Figure I.11 : Vue générale de la voie de recyclage du PG chez *E. coli*.

Les détails sont repris dans le texte ci-avant (Uehara & Park, 2008).

1.2 Les complexes impliqués dans la biosynthèse du PG.

Au cours du cycle cellulaire, la bactérie a besoin d'incorporer du nouveau fragment de PG à la fois pour agrandir le sacculus pendant la phase de croissance de la bactérie et au moment de la division chez les bacilles. La croissance latérale et l'incorporation du PG au site de division font intervenir les acteurs de la synthèse du PG prenant part au sein de deux machineries multiprotéiques et multienzymatiques finement régulées appelées respectivement l'élongasome et le divisome (Typas *et al.*, 2011). Au sein de ces machineries, on retrouve le même type de constituants notamment des hydrolases du PG, les enzymes directement impliqués dans la biosynthèse du PG (MraY, MurG, MurJ, FtsW/RodA, des aPBPs et bPBPs), des éléments du cytosquelette et des protéines régulatrices se localisant dans les différents compartiments de la cellule (Typas *et al.*, 2011 ; Szwedziak & Löwe, 2013). Lorsque les deux machineries sont présentes, comme chez *E. coli*, des interactions existent entre les constituants de ces deux complexes lors de la phase précoce de l'établissement du divisome. Le divisome est constitué en autre de FtsZ, homologue de la tubuline, qui forme une structure dynamique en anneau permettant de recruter les différents éléments du divisome au milieu de la bactérie (Typas *et al.*, 2011). L'élongasome est organisée notamment autour de MreB, homologue de l'actine, guidant l'activité de synthèse du PG bien que cette activité influe également sur la dynamique de MreB (Domínguez-Escobar *et al.*, 2011 ; Garner *et al.*, 2011 ; Van Teeffelen *et al.*, 2011 ; Van den Ent *et al.*, 2014). Des particularités dans la régulation, l'organisation et la composition du divisome et/ou de l'élongasome interviennent dans la variabilité des formes retrouvées parmi les bactéries (Typas *et al.*, 2011 ; Caccamo & Brun, 2018).

1.2.1 Morphogénèse bactérienne et synthèse du PG

Les différentes espèces bactériennes peuvent adopter une très grande diversité de morphologies, plus ou moins complexes, mais stables d'une génération à l'autre, car soumis à des mécanismes de contrôle robustes (Typas *et al.*, 2011). La morphologie des bactéries peut leur conférer un avantage dans l'environnement qu'elles occupent. Par exemple, la forme hélicoïdale d'*Helicobacter pylori* associée à la présence d'un flagelle est adaptée pour pénétrer l'épaisse couche de mucus qui recouvre et protège l'épithélium de l'estomac (Sycuro *et al.*, 2010). Par ailleurs, certaines espèces bactériennes sont capables de modifier leur morphologie pour optimiser leur capacité à survivre et à se reproduire dans des conditions environnementales changeantes : on parle dans ce cas de plasticité morphologique. Par exemple, la souche uropathogénique d'*E. coli* (UPEC) passe du stade bâtonnet non mobile à coque puis à bâtonnet mobile et finalement à un stade de filament dont la taille la protège de la phagocytose au cours de l'infection (Horvath *et al.*, 2011). Différents stress comme l'exposition à des antibiotiques, des carences en nutriments ou encore des modifications des conditions physico-chimiques peuvent induire des changements de morphologie (Ultee *et al.*, 2019). Cette diversité de forme s'explique principalement par des différences d'organisation et de réarrangement d'éléments du cytosquelette associés aux machineries de biosynthèse du PG (élongasome et/ou divisome) (Typas *et al.*, 2011 ; Cacamo & Brun, 2018). Par exemple, il existe une corrélation significative entre la forme cellulaire et l'arrangement du cluster *dcw* comprenant les gènes de la division et de la biosynthèse du PG (Tamames *et al.*, 2001). Néanmoins, on ignore encore bon nombre de mécanismes et signaux moléculaires impliqués dans l'établissement de certaines morphologies (Jiang *et al.*, 2015). Les formes bactériennes les plus classiques et les mieux comprises sont les formes sphériques (coques), ovoïdes, en bâtonnet (bacille), incurvées, hélicoïdales ou encore filamenteuses (Young, 2006). Pour les formes plus complexes, on peut citer les filaments branchés,

les formes « en étoile » etc. Il faut noter que des études phylogénétiques suggèrent que le dernier ancêtre commun des bactéries était de type bâtonnet (Siefert and Fox, 1998).

Morphogénèse chez les bactéries en forme de coque et ovoïdes

Les bactéries en forme de coque se divisent généralement selon deux ou trois plans perpendiculaires alternés au cours des cycles de divisions consécutifs, conduisant respectivement à des assemblages en tétrades ou en paquets cuboïdes de huit cellules (Zapun *et al.*, 2008a). La plupart des coques ne possèdent pas la protéine MreB à l'exception de quelques cas retrouvés chez les cyanobactéries et le genre *Chlamydia* qui ont une forme sphérique, mais qui subissent une différentiation morphologique durant leur cycle de vie (Carballido-lópez *et al.*, 2006). Cependant, les protéines MreC et MreD sont présentes par exemple chez *S. aureus*, mais sont non essentielles à leur croissance et leur absence n'affecte pas la morphologie de la bactérie (Tavares *et al.*, 2015). Dès lors, la biosynthèse du PG est FtsZ dépendante et est déterminante pour la morphogénèse des coques (Pinho & Errington, 2003 ; Zapun *et al.*, 2008a). Néanmoins, il a récemment été démontré que chez *S. aureus* une phase d'elongation discrète est réalisée par le complexe RodA-PBP3 et que la perte de ce complexe induit des bactéries encore plus sphériques (**Figure I.12**) (Reichmann *et al.*, 2019).

Les bactéries ovoïdes (**Figure I.12**) telles les pneumocoques et entérocoques se divisent selon un plan perpendiculaire au grand axe de la bactérie et peuvent éventuellement former des petites chaînes de cellules (Zapun *et al.*, 2008a). Ces bactéries ne possèdent pas de MreB, mais on retrouve les protéines MreCD comme c'est le cas chez *S. pneumoniae* (Land & Winkler, 2011). Ces bactéries synthétisent leur PG principalement au niveau du site de division avec formation des deux nouveaux hémisphères (Ng *et al.*, 2004 ; Zapun *et al.*, 2008a). Un modèle incluant un second site de biosynthèse du PG a été également proposé (Higgins & Shockman, 1976). Selon ce modèle, cette biosynthèse périphérique devrait se réaliser suivant un gradient d'activité avec une activité maximale proche du site de division. L'idée est que les ovococci auraient deux systèmes de synthèse du PG. Ce modèle a été confirmé expérimentalement par de nombreuses expériences (Gibson *et al.*, 1983 ; Lleo *et al.*, 1990). Ces deux types de biosynthèses seront nommées : septal pour la formation du PG transversal (perpendiculaire au grand axe de la cellule) et périphérique pour la composante longitudinale (Higgins & Shockman, 1976). La protéine cytoplasmique GspB joue un rôle central dans l'équilibre entre la biosynthèse du sPG et périphérique (Rued *et al.*, 2017). GspB contient notamment un domaine qui ressent la courbure de la membrane, que l'on retrouve également dans la protéine DivIVA et ses homologues (voir ci-après) (Cleverley *et al.*, 2019). Le modèle contrôlant l'équilibre entre la biosynthèse septale et latérale est le suivant : DivIVA non phosphorylé promeut la synthèse latérale et GspB promeut celle du sPG. En effet, GspB joue le rôle d'adaptateur moléculaire en interagissant avec la kinase StpK et DivIVA, cette dernière est phosphorylée, le tout recrutant les acteurs de la synthèse septale au site de division (Fleurie *et al.*, 2014 ; Cleverley *et al.*, 2019). La protéine Ezra fait l'intermédiaire entre FtsZ et GspB/DivIVA (Fleurie *et al.*, 2014) (**Figure I.12**). Plus récemment, une protéine à 8 segments transmembranaires, CozE, a été identifiée et pourrait servir à connecter PBP1a et RodA et d'autres composants de la machinerie de l'elongation chez *S. pneumoniae* en interagissant avec PBP1a et MreCD (Fenton *et al.*, 2016).

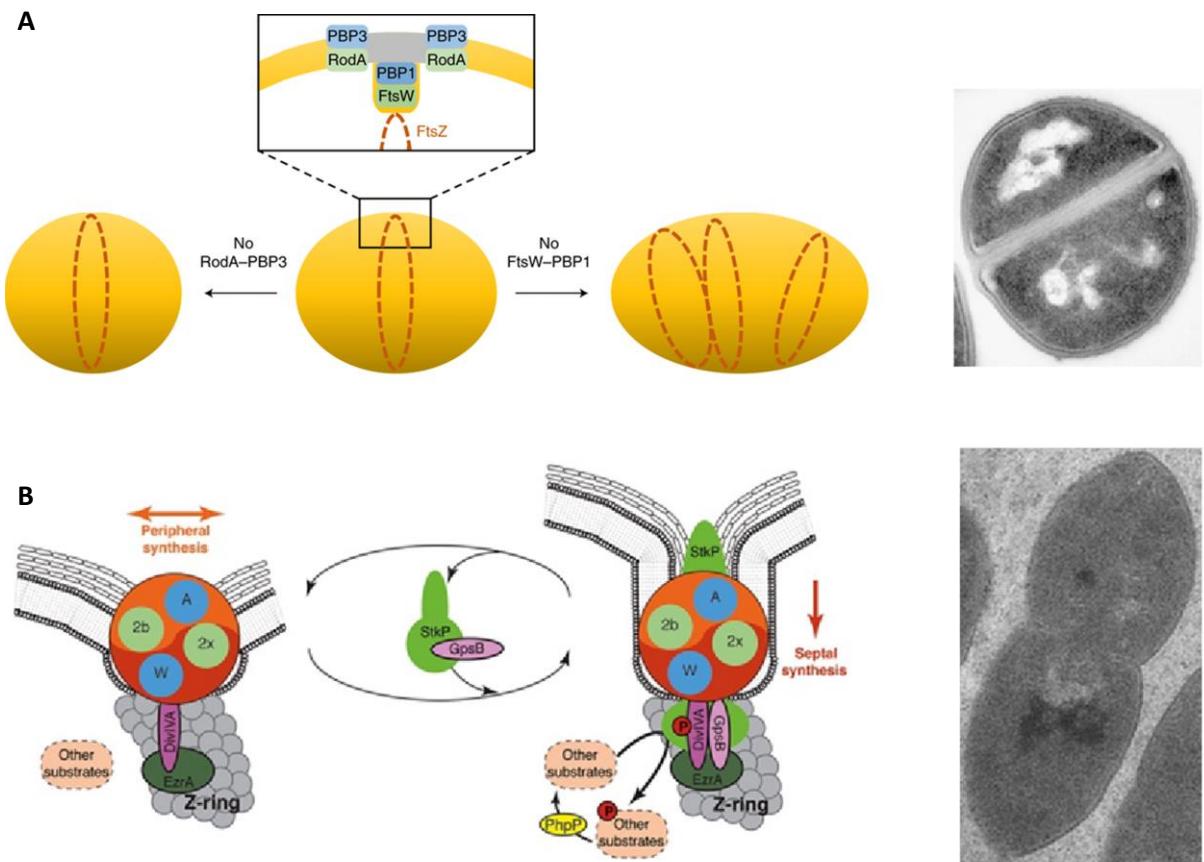


Figure I.12 : Maintien de la forme bactérienne chez *S. aureus* et *S. pneumoniae*.

- A. Chez *S. aureus*, la biosynthèse septale implique le complexe FtsW-PBP1 et la biosynthèse latérale est réalisée par le complexe RodA/PBP3. En haut à droite, une cellule de *S. aureus* se divisant, vue en microscopie électronique (Reichmann *et al.*, 2019 ; Zapun *et al.*, 2008a).
- B. Modèle de synthèse du PG chez *S. pneumoniae* impliquant les protéines PBP2b (2b) et RodA (A) (synthèse latérale en orange) ainsi que PBP2x (2x) et FtsW (W) (synthèse septale en rouge) (pour plus de détails voir texte). À droite, une cellule de *S. pneumoniae* se divisant vue en microscopie électronique (Fleurie *et al.*, 2014 ; Zapun *et al.*, 2008a).

Morphogénèse chez les bactéries en forme bâtonnet

La morphologie en forme de bâtonnet est, dans l'immense majorité des cas, liée à la présence des protéines MreBCD, de RodZ et de la paire RodA/bPBP formant le cœur du complexe Rod (Wachi *et al.*, 1989 ; Cho *et al.*, 2016 ; Alyahya *et al.*, 2009 ; Bendezú *et al.*, 2009). Le maintien de la forme est dès lors dicté par l'action des deux complexes que sont l'élongosome et le divisome s'organisant respectivement autour de MreB et FtsZ (**Figure I.13**). La protéine MreB est essentielle au maintien de la morphologie en bâtonnet. En effet, l'inhibition de sa polymérisation par l'inhibiteur A22 induit une forme sphérique (Van den Ent *et al.*, 2014). MreB s'établit dans les régions de courbure négative à l'exception des pôles dû à la présence de phospholipides anioniques et dirige la biosynthèse du PG en percevant et en renforçant le degré de courbure de la bactérie (Kawazura *et al.*, 2017 ; Hussain *et al.*, 2018). Chez *E. coli*, il a été montré que MreB établirait également des interactions avec FtsZ afin d'assurer la transition entre l'élongation et la division, nécessaire au bon établissement de l'appareil de division et au maintien de la forme

bactérienne (Fenton & Gerdes, 2013). La perte de MreB, notamment chez *E. coli* mais aussi chez *Caulobacter* ou encore *Pseudomonas*, mène à la perte de l'intégrité morphologique de la bactérie et à la mort de celle-ci (Shi *et al.*, 2017 ; Takacs *et al.*, 2010, Robertson *et al.*, 2007). Chez *B. subtilis*, il a été proposé que les aPBPs et le complexe Rod auraient des effets opposés vis-à-vis du diamètre de la cellule : l'activité du complexe Rod diminue le diamètre de la cellule alors que les aPBPs l'augmentent (Dion *et al.*, 2019). Dès lors, c'est l'équilibre entre ces deux systèmes qui assure le maintien du diamètre de la bactérie (Dion *et al.*, 2019). Cependant chez *E. coli*, des résultats suggèrent que les aPBPs sont responsables du maintien de l'intégrité du PG de manière locale, mais n'auraient pas de réelle fonction dans le maintien de la morphologie bactérienne (Vigouroux *et al.*, 2020) (une description plus complète de l'élongosome d'*E. coli* sera faite au point 1.2.2.1).

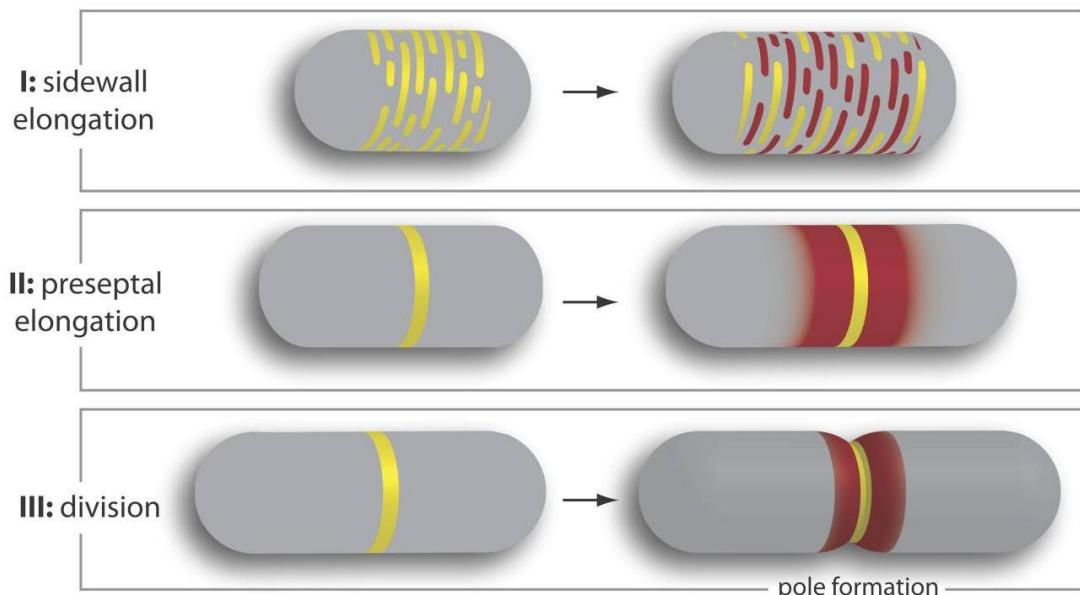
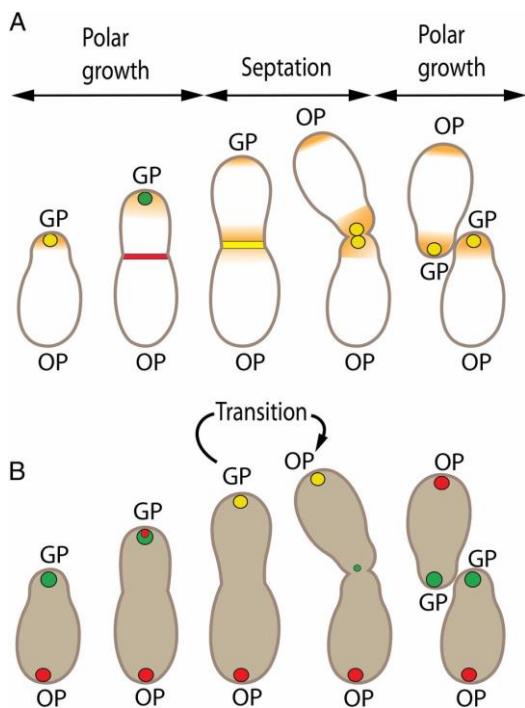


Figure I.13 : Modèle du mécanisme majoritaire de maintien de la forme en bâtonnet chez les bacilles.

Chez les bactéries, tel *E. coli*, possédant la machinerie d'élongation (élongosome), la biosynthèse du PG, assurant la forme bactérienne en bâtonnet, est réalisée en trois phases : (I) la synthèse de la paroi latérale (MreB dépendante), (II) la synthèse pré-septale (FtsZ dépendante, mais PBP3 indépendante) (III) et la synthèse septale (FtsZ dépendante) (Cabeen & Jacobs-Wagner, 2007). En jaune et rouge sont respectivement représenté l'organisation du cytosquelette (MreB ou FtsZ) et les zones actives de synthèse du PG.

L'absence de MreB, chez quelques bactéries, ne mène pas toujours à une morphologie sphérique, mais bien à une morphologie de type bâtonnet : la morphologie bâtonnet peut donc être MreB-indépendante (Daniel & Errington, 2003). Ceci est observé chez les actinobactéries (streptomycètes, mycobactéries et corynabactéries) et chez les genres *Bradyrhizobium* et *Agrobacterium* (Daniel & Errington, 2003). Ces bactéries maintiennent leur forme en bâtonnet en synthétisant du nouveau PG aux pôles plutôt que par insertion de nouveau matériel dans la paroi latérale (Daniel & Errington, 2003 ; Siegrist *et al.*, 2013 ; Liechti *et al.*, 2014). Cette biosynthèse de nouveau matériel peut se faire à un pôle unique comme c'est le cas chez *Agrobacterium tumefaciens*, ou aux deux pôles comme c'est le cas chez *Corynebacterium glutamicum*, on parle respectivement de croissance unipolaire (Figure I.14) et bipolaire (Figure I.15). *A. tumefaciens* est dépourvue des protéines MreBCD ainsi que de RodA/Z et PBP2 (Alyahya *et al.*, 2009 ; Zupan *et al.*, 2013 ; Cameron *et al.*, 2014). FtsZ et FtsA montrent une localisation au niveau du pôle et

participent à la croissance de ce pôle en guidant l'activité notamment de PBP1a et de LD-transpeptidases (LDTs), principalement Atu0845 (Cameron *et al.*, 2014). Avant la division cellulaire, FtsZ quitte le pôle en premier, rejoint par FtsA, PBP1a, PBP3, FtsW et des LDTs (Cameron *et al.*, 2014 ; Howell *et al.*, 2019). Une fois la division terminée, l'ancien septum devient le nouveau site de croissance polaire où se trouvent déjà les acteurs de la synthèse du PG (Cameron *et al.*, 2014). Par ailleurs, des marqueurs d'identité polaires ont été identifiés chez *A. tumefaciens*. En effet, PopZ se localise au niveau du pôle en croissance alors que PodJ se localise à l'ancien pôle pendant la phase de croissance polaire (Grangeon *et al.*, 2015). Cependant, PodJ commence à s'accumuler au nouveau pôle à la fin de la phase de croissance, et se co-localise avec PopZ, puis reste à ce pôle après la division, marquant ainsi le nouveau pôle (Grangeon *et al.*, 2015). Plus récemment, il a été démontré que FtsZ et PopZ sont, en outre, tous deux essentiels à la formation du divisome (Howell *et al.*, 2019). En particulier, FtsZ est également essentiel pour mettre fin à la croissance polaire et initier la synthèse du septum (Howell *et al.*, 2019). Il se pourrait que FtsZ et PopZ fonctionnent ensemble à la fin de la croissance polaire pour initier le début de la synthèse du septum (Howell *et al.*, 2019 ; Grangeon *et al.*, 2015).



(Grangeon *et al.*, 2015).

Chez *C. glutamicum*, la protéine RsmP a été identifiée comme essentielle à l'établissement de la morphologie en bâtonnet (Fiuza *et al.*, 2010). Cette protéine est capable de former des filaments *in vitro* et *in vivo* (Fiuza *et al.*, 2010). En outre, elle partage des caractéristiques structurales avec les filaments intermédiaires des eucaryotes, tel un domaine « coil-coiled » central et peut notamment subir des phosphorylations par les kinases STPKs régulant la localisation polaire de la protéine (Fiuza *et al.*, 2010). À l'instar de MreB, les filaments de RsmP fourniraient une structure, en plus de DivIVA qui recruterait notamment RodA, guidant la synthèse polaire du PG chez ces bactéries (Fiuza *et al.*, 2010 ; Sieger and Bramkamp, 2015). La protéine DivIVA est retrouvée chez beaucoup de bactéries à Gram positif (*B. subtilis*, *S. pneumoniae*, *S. coelicolor*,...), elle est souvent phosphorylée, sauf chez les corynibactéries, et assurerait de multiples fonctions, dont un rôle dans la division, la croissance polaire et la morphogénèse de manière

générale en agissant notamment comme des « adaptateurs » coordonnant l'activité de biosynthèse du PG avec d'autres processus cellulaires (Hammond *et al.*, 2019; Cleverley *et al.*, 2019). Chez *M. tuberculosis*, la protéine DivIVA est essentielle pour le maintien de la morphologie de la bactérie et est phosphorylée par les kinases PnkA/PnkB (Kang *et al.*, 2005). L'hypothèse est que PnkB interagirait avec le PG via son domaine PASTA (« Penicillin-Binding Protein and serine/threonine kinase associated domain »), phosphorylerait PnkA, qui phosphorylerait notamment DivIVA (Kang *et al.*, 2005). Cette protéine phosphorylée se localise principalement au niveau des pôles, et dans une moindre mesure au site de division, pour guider la synthèse du PG (Kang *et al.*, 2005 ; Cleverley *et al.*, 2019). L'interaction de DivIVA avec PBP3 chez *M. tuberculosis* renforce cette hypothèse (Mukherjee *et al.*, 2009).



Figure I.15 : Modèle de croissance bipolaire chez *M. tuberculosis* et *C. glutamicum*.

En rouge sont représentées les zones de biosynthèse du PG.

Morphogénèse chez les bactéries dimorphiques

La bactérie dimorphique à Gram négatif *Caulobacter crescentus* est une bactérie de forme incurvée (**Figure I.16**). Cette bactérie se divise en donnant naissance à une cellule fille avec un flagelle et une cellule fille qui peut se fixer sur un substrat via une protubérance (« stalked cell »). Cette bactérie possède tout l'arsenal essentiel à l'établissement de la morphologie en bâtonnet MreB-dépendante. *Caulobacter* contient également une protéine de type filament intermédiaire essentielle à l'établissement de la morphologie courbée : la crescentine (Ausmess *et al.*, 2003 ; Woldemeskel & Goley, 2017). Cette protéine forme des filaments qui induiraient une courbure en exerçant une force de compression sur la paroi qui réduirait la tension au niveau des liens peptidiques du PG rendant l'insertion de nouveau matériel plus difficile (Cabeen *et al.*, 2009). Il y aurait donc un gradient de synthèse du PG le long du petit axe de la cellule conduisant à la courbure, car plus de PG est inséré du côté opposé aux filaments de crescentine. Ce mécanisme de courbure induite nécessite la polymérisation de la crescentine et son ancrage à la membrane (Cabeen *et al.*, 2009 & 2010 ; Charbon *et al.*, 2009). Le mécanisme d'ancrage n'est pas parfaitement élucidé, mais semble dépendre des filaments de MreB (Charbon *et al.*, 2009 ; Dye *et al.*, 2011). Une autre protéine capable de polymériser joue un rôle dans la régulation de la courbure de cette bactérie, il s'agit de la CTP synthétase, qui semble s'opposer à l'action de la crescentine, indépendamment de son activité enzymatique (Ingerson-Mahar *et al.*, 2010). En effet, l'augmentation du niveau de CTP synthase induit à une morphologie moins courbée tandis qu'une faible expression induit une hyper-courbure de la bactérie (Ingerson-Mahar *et al.*, 2010). Concernant la formation du pédoncule, cette protubérance caractéristique de la forme sessile de *C. crescentus*, différents déterminants ont été identifiés. En effet, les bactofilines BacA et BacB s'assemblent pour former une structure en feuillet s'associant à la membrane à la base du pédoncule. Cette structure est nécessaire pour le recrutement du PBP de classe A PBPC qui est à son tour nécessaire pour le recrutement de StpX bien que les détails mécanistiques soient encore peu clairs (Kühn *et al.*, 2010 ; Hughes *et al.*, 2010 & 2013). D'autres facteurs sont essentiels à l'établissement de la morphologie de *Caulobacter* tel MipZ formant un gradient à partir des pôles et inhibant la formation de l'anneau FtsZ ou encore TipN, une protéine membranaire marquant

le nouveau pôle et régulant la dynamique de MreB au niveau du plan de division (Thanbichler & Shapiro, 2006 ; Lam *et al.*, 2006). Enfin, le facteur PopZ intervient notamment dans la transition du pôle flagellé au pôle pédonculé en recrutant des facteurs de remodelage du PG (Bowman *et al.*, 2010; Laloux and Jacobs-Wagner, 2013).

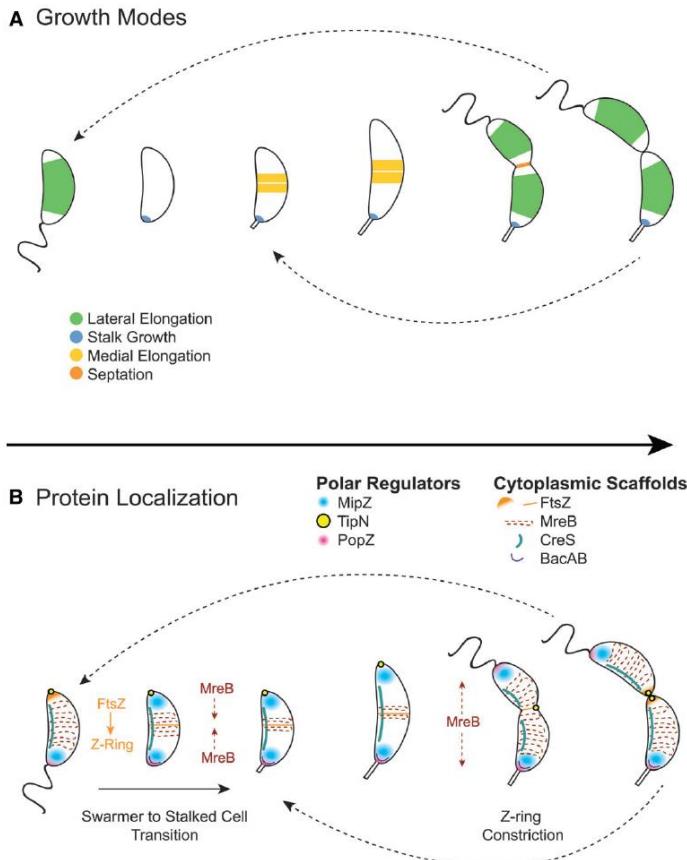


Figure I.16 : Croissance et morphogénèse chez *Caulobacter crescentus*.

A. *C. crescentus* croît par différents moyens : la croissance latérale, l'élargissement du pédoncule, une élargissement médiane et la synthèse du sPG (voir code couleur).

B. Dans la cellule avec un flagelle, MipZ se localise au pôle flagellé, FtsZ se forme au pôle opposé et MreB se dispersent dans la cellule. La transition flagelle-pédoncule implique la bactofiline et le recrutement de la machinerie de synthèse du PG initié par PopZ. Au début de la réplication chromosomique, le complexe MipZ-ParB lie le nouveau chromosome, migrant vers le nouveau pôle, déplaçant dès lors FtsZ vers le site de division où MreB vient se condenser également avant de se disperser à nouveau en raison de TipN. Après division, FtsZ se retrouve dans les cellules pédonculées pour guider l'élargissement médiane (Randich & Brun, 2015).

Morphogénèse chez les bactéries en forme de torsade

La bactérie à Gram négatif *Helicobacter pylori* présente une structure torsadée avec une succession de courbures négatives et positives (Taylor *et al.*, 2020). Cette bactérie possède les gènes typiques de l'élargissement *mreB* et *mreC*, mais est dépourvue de *mreD* et de *rodZ* (Margolin, 2009). Plusieurs hydrolases ont été identifiées comme importantes dans la morphogénèse d'*H. pylori* : Csd1 et Csd2 (DD-endopeptidases), Csd3 DD-endopeptidase/DD-carboxypeptidase) Csd4 et Csd6 (LD-carboxypeptidases) et les deux protéines dépourvues d'activité enzymatique Csd5 et CcmA (Sycuro *et al.*, 2010 ; Bonis *et al.*, 2010 ; Chan *et al.*, 2015 ; Kim *et al.*, 2015). Dès lors, la forme d'*H. pylori* semble fortement liée au remodelage des pontages du PG (Sycuro *et al.*, 2010). Il a été montré que Csd5, présentant un segment transmembranaire et un domaine SH3 de liaison au PG, est requis pour établir la morphologie hélicoïdale de la bactérie (Blair *et al.*, 2018). Par ailleurs Csd5, CcmA, MurF et l'ATP synthétase interagissent dans le cadre d'un ou plusieurs complexes multiprotéiques (Blair *et al.*, 2018). La protéine CcmA a été identifiée récemment comme un acteur majeur de la morphologie d'*H. pylori* (Taylor *et al.*, 2020). Cette protéine est une bactofiline, capable de former un réseau de filaments *in vitro* et se localise aux endroits à courbure positive où une synthèse de PG accrue est observée (Taylor *et al.*, 2020). Le modèle établi est le suivant :

CcmA qui se localise préférentiellement dans la zone du grand axe hélicoïdal, favorise la synthèse au niveau de la courbure positive et complète la synthèse de PG de manière MreB-dépendante dans ces zones, cette synthèse étant plus forte au niveau du petit axe hélicoïdal (courbure négative) (**Figure I.17**) (Taylor *et al.*, 2020).

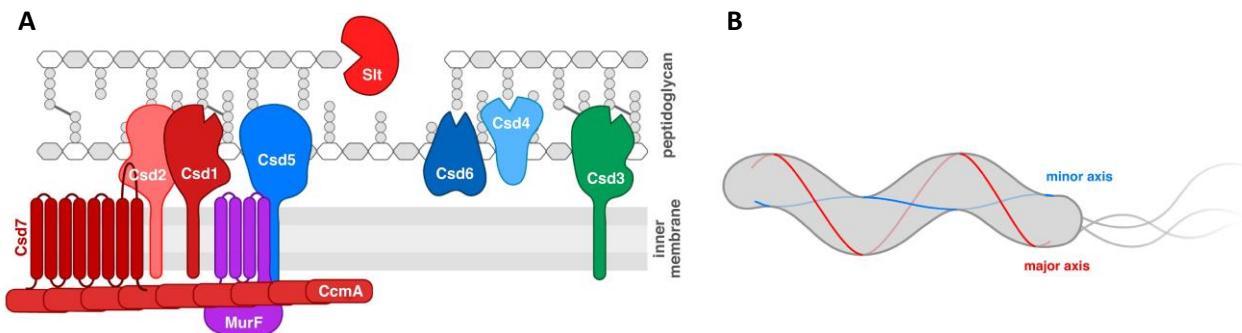


Figure I.17 : Déterminant de la morphologie d'*Helicobacter pylori*.

- A. Modèle reprenant les protéines et interactions importantes pour l'établissement de la morphologie *H. pylori*.
- B. Représentation schématique des deux axes de la bactérie *H. pylori*. CcmA favorisant la synthèse au niveau de la courbure positive (« major axis ») (Salama *et al.*, 2020). Voir détails dans le texte ci-dessus.

Morphogénèse chez les bactéries filamentueuses

Chez *Streptomyces coelicolor*, une bactérie filamentueuse qui subit une croissance polaire, la protéine DivIVA est essentielle et se localise aux extrémités des hyphes et aux sites de branchage de ces derniers (**Figure I.18**). DivIVA, phosphorylé au moins par AfsK, promeut la synthèse du PG aux pôles et régule le degré de branchage des filaments (Flärdh, 2003 ; Hempel *et al.*, 2008 ; Hempel *et al.*, 2012). DivIVA interagit notamment avec des protéines de type « filament intermédiaire » Scy et FilP pour former le « polarosome » qui guide la synthèse du PG et la croissance des hyphes (Holmes *et al.*, 2013 ; Fuchino *et al.*, 2013 ; Fröjd & Flärdh, 2019).

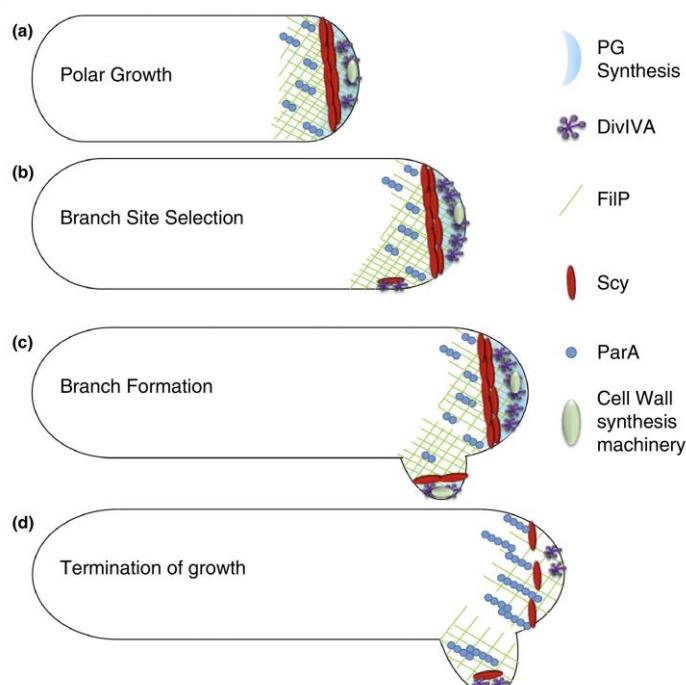


Figure I.18 : Croissance et branchage des hyphes chez *S. coelicolor*.

- (a) Le « polarosome » guidant la croissance polaire de la paroi, comprend les protéines DivIVA, Scy, and FilP.
- (b) Un nouveau polarosome se crée au site de branchage, futur site de synthèse du PG.
- (c) Le polarosome est mature et est associé à la machinerie de synthèse du PG : le branchage débute.
- (d) La terminaison de la croissance polaire, avant la sporulation, nécessite le désassemblage du polarosome. Les filaments de ParA interviennent dans l'organisation des chromosomes dans les préspores. (Howell & Brown, 2016).

1.2.2 Complexe de synthèse du PG et cycle cellulaire d'*Escherichia coli*

Comme mentionné ci-dessus, la bactérie s'allonge au début du cycle cellulaire d'*E. coli*, juste après la division, grâce à l'action de l'élongasome dirigeant l'insertion de nouveaux fragments de PG (Figure I.19). L'établissement de la machinerie de divisome, qui participera à la synthèse du peptidoglycane au site de division, débute à environ 20 % d'accomplissement du cycle cellulaire pour s'achever à 60% du cycle cellulaire, qui correspond au début de la phase de constriction cellulaire avant la séparation des deux cellules filles (den Blaauwen, 2008 ; van der Ploeg *et al.*, 2013). Bien que l'élongasome et le divisome constituent deux complexes distincts, des contacts entre ces derniers ont lieu comme cela sera décrit ci-après. En effet, durant l'intervalle de temps correspondant à la période entre 20 et 40 % du cycle cellulaire, l'elongation de la bactérie va impliquer les composants des deux machineries dans une phase de transition appelée synthèse pré-septale (den Blaauwen, 2008 ; van der Ploeg *et al.*, 2013).

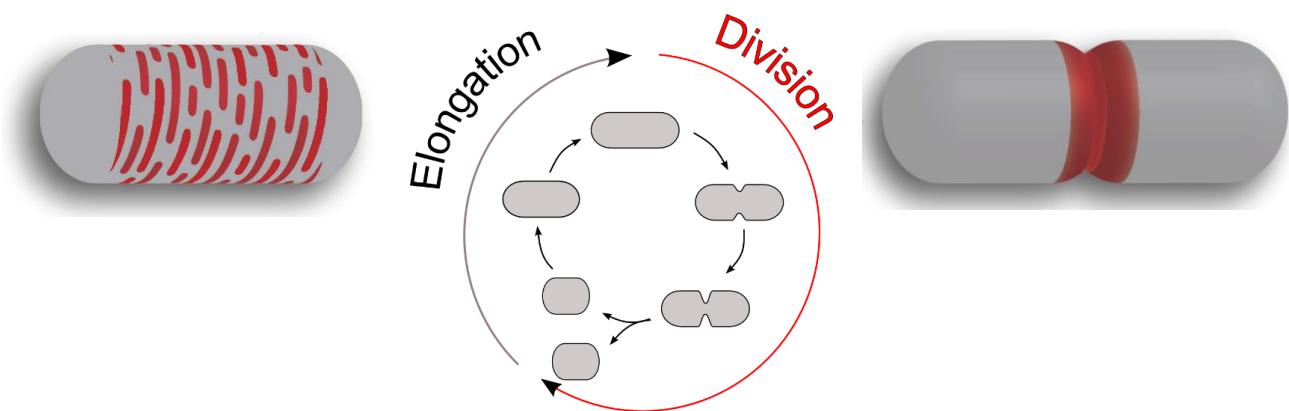


Figure I.19 : Représentation schématique des événements du cycle cellulaire d'*E. coli*.

Les zones en rouge sur les schémas de bactéries représentent l'insertion du nouveau PG par l'élongasome (à gauche) et le divisome (à droite) (den Blaauwen, 2008).

1.2.2.1 L'élongasome d'*Escherichia coli*

L'élongasome d'*E. coli* est constitué de MreB, MreC, MreD, RodZ, RodA, PBP2, PBP1a et son activateur LpoA ainsi que d'autres protéines associées à la synthèse du PG et son remodelage (MurA-F, MraY, MurG, MurJ et des hydrolases) (Figure I.20) (Typas *et al.*, 2011). De nombreux résultats montrent l'importance de PBP1a dans l'elongation d'*E. coli* et associent donc cette protéine avec l'élongasome, insérant du nouveau PG dans la paroi latérale. Néanmoins, les mouvements de PBP1a ne suivent pas ceux des autres protéines associées à MreB (Cho *et al.*, 2016). On peut donc dire que PBP1a est associé à l'elongation de la bactérie, mais n'est probablement pas associé physiquement, du moins de manière durable, à l'élongasome. Cela n'exclut pas des contacts transitoires entre PBP1a et les autres composants de l'élongasome. Notamment, il a été démontré que : PBP2 interagit avec PBP1a et stimule son activité, l'absence de PBP1a réduit le diamètre cellulaire et augmente le temps avant la formation du divisome (Banzhaf *et al.*, 2012).

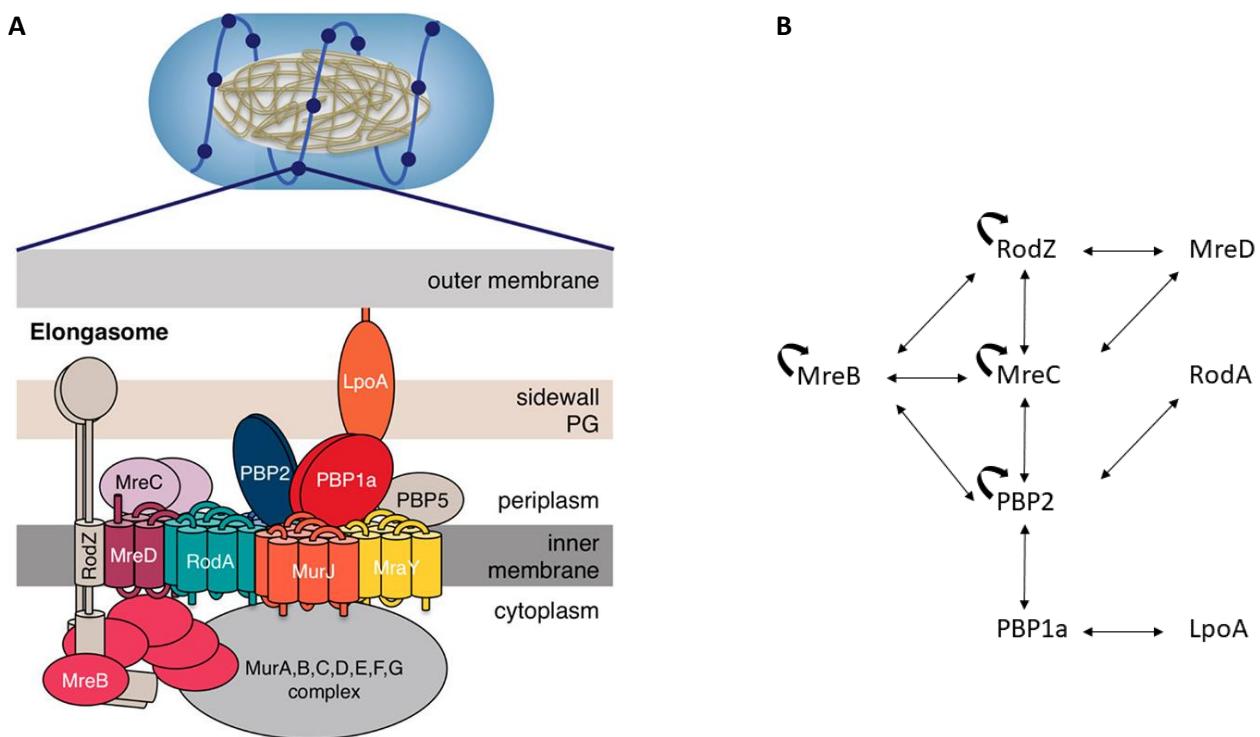


Figure I.20 : Vue générale des principaux constituants de l'élongasome et de leurs interactions chez *E. coli*.

A. Représentation schématique des protéines de l'élongasome chez *E. coli* (voir texte).

B. Schéma d'interaction entre protéines formant le cœur de l'élongasome : les doubles flèches indiquent des interactions démontrées. Les flèches recourbées montrent une interaction de la protéine avec elle-même (voir texte) (Dik *et al.*, 2018).

Comme précédemment mentionné, MreB est la protéine organisatrice de l'élongasome chez la plupart des bactéries en bâtonnet. Il s'agit d'une protéine homologue de l'actine, caractérisée par deux domaines (I et II) (Ayako *et al.*, 1992 ; Van den Ent *et al.*, 2001). Ces domaines sont divisés en deux grands sous-domaines (IA et IIA) et deux plus petits sous-domaines (IB et IIB) (Van den Ent *et al.*, 2001). Un site de liaison pour un nucléotide se dessine dans le sillon formé entre les domaines I et II (Van den Ent *et al.*, 2001). Chez *E. coli* notamment, MreB forme des paires de protofilaments antiparallèles, en présence d'ATP ou de GTP (Van den Ent *et al.*, 2014). Cette architecture permet à la courte hélice α N-terminale amphiphile de MreB d'ancre les filaments à la membrane, une propriété essentielle pour la fonction de MreB (Salje *et al.*, 2011 ; Van den Ent *et al.*, 2014). Cette hélice n'est retrouvée que chez les bactéries à Gram négatif, chez les bactéries à Gram positif une petite boucle hydrophobe N-terminale dans le domaine IA joue le même rôle (Salje *et al.*, 2011 ; Van den Ent *et al.*, 2014). Comme déjà mentionné, MreB forme de courts filaments associés à la membrane en mouvement le long de la circonférence de la bactérie, à l'exception des pôles (Van Teeffelen *et al.*, 2011 ; Domínguez-Escobar *et al.*, 2011 ; Garner *et al.*, 2011 ; Kim *et al.*, 2006). La dynamique de MreB est étroitement liée à la synthèse du PG, étant donné que l'usage d'antibiotiques ciblant le PG inhibe les mouvements des filaments de MreB (Kruse *et al.*, 2005 ; Domínguez-Escobar *et al.*, 2011 ; Garner *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2014 ; Van Teeffelen *et al.*, 2011). Par ailleurs, les sites d'insertions de PG sont corrélés avec la localisation de MreB (Billings *et al.*, 2014 ; Hussain *et al.*, 2018). Le couplage entre MreB et la synthèse du PG pourrait être réalisé via les protéines MreC, MreD et RodZ (Kruse *et al.*, 2005 ; Shi *et al.*, 2018 ; Ago & Shiomi, 2019). De plus, sur base de mutations ponctuelles, il a été montré que la vitesse de rotation des filaments de MreB influence le

diamètre de la cellule : plus la rotation est rapide, plus le taux d'insertion de PG est grand et plus la cellule est fine (Shiomi *et al.*, 2013 ; van den Ent *et al.*, 2014 ; Morgenstein *et al.*, 2015 ; Kurita *et al.*, 2019). L'ensemble de ces résultats suggère un modèle de «feedback» entre la dynamique de MreB et la synthèse du PG durant la phase d'élargissement de la bactérie : la localisation de MreB est déterminée localement par la forme de la bactérie (courbure négative) et MreB dirige la croissance de la bactérie pour localement préserver la forme bactérienne (Sliusarenko *et al.*, 2010 ; Salje *et al.*, 2011 ; Colavin *et al.*, 2014 ; Hussain *et al.*, 2018 ; Billings *et al.*, 2014 ; Renner *et al.*, 2013 ; Ursell *et al.*, 2014 ; Shi *et al.*, 2018). La reconnaissance de la courbure négative par MreB serait notamment liée à la liaison de l'ATP qui a tendance à courber les filaments (Colavin *et al.*, 2014) et à l'interaction avec RodZ, qui favoriserait la perception de la courbure par MreB (Colavin *et al.*, 2018 ; Bratton *et al.*, 2018).

La protéine MreC est une protéine bitopique présentant une large portion périplasmique. Plusieurs structures de cette portion ont été obtenues et révèlent une organisation assez similaire avec 2 domaines en feuillet β pouvant former un dimère (Van Den Ent *et al.*, 2006 ; Lovering & Strynadka, 2007 ; Contreras-Martel *et al.*, 2017). Cette organisation est en accord avec la formation de filaments observée *in vivo* (Dye *et al.*, 2005 ; Divakaruni *et al.*, 2005 ; Van Den Ent *et al.*, 2006 ; Lovering & Strynadka, 2007). Il avait été suggéré que MreC aurait pour rôle de recruter les acteurs de la synthèse du PG en interagissant avec MreD, RodZ et des PBPs dont PBP2 (Leaver & Errington, 2005 ; El Ghachi *et al.*, 2011 ; Ikebe *et al.*, 2018). Une structure de la partie périplasmique de MreC et PBP2 confirme ce rôle et suggère une modulation de l'activité de PBP2 par MreC (**Figure I.21.B**) (Contreras-Martel *et al.*, 2017).

MreD est une protéine polytopique qui interviendrait dans le couplage entre MreB et la synthèse du PG (Leaver & Errington, 2005, Kruse *et al.*, 2005). Il a notamment été montré que MreD est essentiel pour la synthèse du PG latéral et interagit avec MurG et MraY (White *et al.*, 2010). Plus récemment, un modèle a été proposé dans lequel MreD interagit avec PBP2 et bloque la synthèse du PG par RodA/PBP2 puis l'accumulation de MreC supprimerait l'inhibition par MreD et active la synthèse du PG (Liu *et al.*, 2019).

RodZ est une protéine non essentielle, mais la délétion ou des mutations dans RodZ conduisent à des morphologies aberrantes, sphériques ou ovoïdes, chez *E. coli* et d'autres bactéries (Shiomi *et al.*, 2008 ; Bendezú *et al.*, 2009 ; Alyahya *et al.*, 2009 ; Bendezú & Boer, 2008 ; Muchová *et al.*, 2013). RodZ est une protéine membranaire bitopique avec un domaine cytoplasmique hélice-boucle-hélice en N-terminal pouvant interagir avec MreB, monomérique ou sous forme de filament, et avec lui-même (Bendezú *et al.*, 2009 ; Van Den Ent *et al.*, 2010). Ce domaine est suivi d'une région juxtamembranaire importante pour le rôle de RodZ dans la morphogénèse bactérienne (Mitobe *et al.*, 2011). La partie périplasmique de RodZ n'est pas essentielle au maintien de la forme bactérienne (Shiomi *et al.*, 2008). Sur base d'une étude RMN réalisée sur la protéine RodZ de *B. subtilis*, la partie périplasmique est formée de domaines désordonnés suivis d'un domaine contenant neuf brins β (Pereira *et al.*, 2015). Des interactions intramoléculaires de RodZ, via la région désordonnée, seraient impliquées dans la dimérisation ou la multimérisation de la protéine. (Ikebe *et al.*, 2018).

RodZ forme des structures similaires à celle de MreB, à savoir des structures spirales en «patch» dans la partie cylindrique de la bactérie (Yoshii *et al.*, 2019, Ikebe *et al.*, 2018). D'ailleurs, la localisation de RodZ dépend de MreB, il en va de même pour l'initiation de l'assemblage des patchs de RodZ (Bendezú *et al.*, 2009). Inversement, RodZ est requis pour un bon assemblage de MreB, de manière directe et/ou par l'intermédiaire d'autres protéines, notamment en modulant les contacts latéraux entre filaments de MreB (Van den Ent *et al.*, 2011 ; Bratton *et al.*, 2018, Shiomi *et al.*, 2013, Van den Ent *et al.*, 2014). De plus, RodZ montre la même dynamique de mouvement que MreB et semble établir un lien entre MreB et le

complexe RodA/PBP2 (Morgenstein *et al.*, 2015). En résumé, RodZ et MreB sont interdépendants pour leur organisation et localisation, ainsi que pour la dynamique du complexe Rod.

La protéine RodA, appartenant à la famille SEDS, est une protéine à dix hélices α transmembranaires, avec une large boucle périplasmique entre les hélices α 7/8 et formant un complexe avec PBP2, un bPBP (Fay *et al.*, 2010 ; Sjödt *et al.*, 2018). PBP2 est une protéine qui possède, une courte portion périplasmique, une hélice transmembranaire, un domaine transpeptidase C-terminal et un domaine non catalytique N-terminal (Contreras-Martel *et al.*, 2017 ; Sjödt *et al.*, 2018). Il a été démontré que PBP2 joue un rôle crucial à la fois dans la stimulation de la synthèse du PG latéral, mais également dans la modulation de la formation des filaments de MreB pour orienter la synthèse du PG. (Hussain *et al.*, 2018 ; Rohs *et al.*, 2018 ; Özbaykal *et al.*, 2020). Comme précédemment mentionné, PBP2 est en interaction avec MreC, au moins pendant un moment, ce qui stimule son activité (Rohs *et al.*, 2018). Il avait été montré également que PBP2 stimulate les activités de PBP1a et RodA (Banzhaf *et al.*, 2012, Rohs *et al.*, 2018). Une structure cristallographique du complexe RodA/PBP2 révèle des interactions au niveau membranaire et au niveau périplasmique (Sjödt *et al.*, 2020). En effet, suite à l'interaction on observe un déplacement de l'hélice α 7 de RodA ouvrant une cavité dans la protéine : la structure confirme le rôle du domaine N-terminal de PBP2 dans l'activation de RodA (**Figure I.21.A**) (Sjödt *et al.*, 2020).

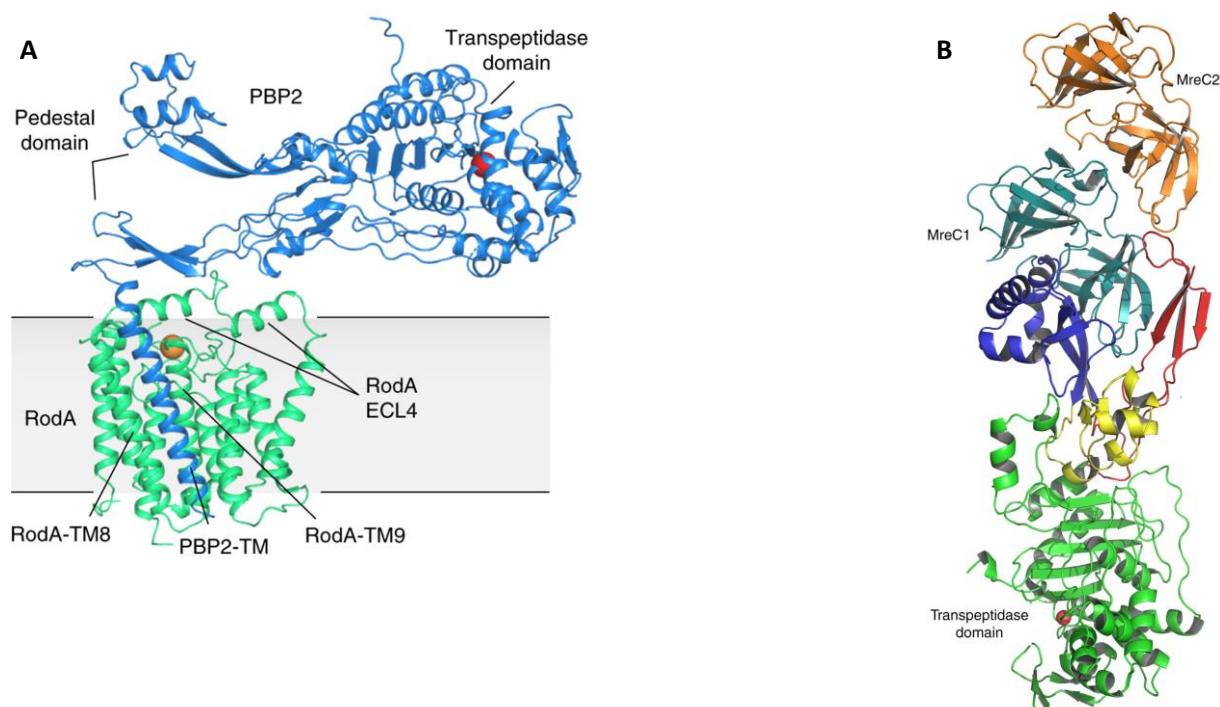


Figure I.21 : Structure des complexes RodA-PBP2 et MreC-PBP2.

- Structure du complexe RodA-PBP2 de *Thermus thermophilus*. Les résidus actifs des deux protéines sont représentés avec les sphères rouge et orange (Sjödt *et al.*, 2020).
- Structure du complexe MreC-PBP2 d'*H. pylori* présentant deux molécules de MreC (MreC1 et 2) dans l'unité asymétrique. La sérine active de PBP2 est représentée avec une sphère rouge (Contreras-Martel *et al.*, 2017).

1.2.2.2 Phase de transition entre élongation et division

À la fin de la phase d'élongation, on distingue une phase de transition où les protéines de l'élongation et celles de la division coexistent et interagissent avant l'entrée de la cellule en phase de division proprement dite. Il a été montré que MreB se localise au site de division de manière FtsZ-dépendante (Vats & Rothfield, 2007 ; Vats *et al.*, 2009) et que PBP2 interagit avec PBP3 (van der Ploeg *et al.*, 2013) suggérant que des éléments de l'élongasome sont en interaction avec ceux du divisome au site de division. De plus, une interaction directe entre MreB et FtsZ est importante pour la transition entre l'élongation et la division (Fenton & Gerdes, 2013). Plus récemment, il a été démontré que la protéine RodZ se localise de manière transitoire au site de division et facilite la formation du divisome (Yoshii *et al.*, 2019). Par ailleurs, une courte élongation dépendante de FtsZ et appelée élongation pré-septale, a été observée chez *E. coli*. Ce mode de synthèse participe de manière plus importante à la croissance de *C. crescentus* (Aaron *et al.*, 2007 ; Typas *et al.*, 2011). Cette synthèse FtsZ-dépendante est PBP3-indépendante car elle se manifeste en présence d'aztreoname, inhibant spécifiquement PBP3 (Nanninga, 1991). L'élongation pré-septale dépend également de ZipA et du PBP1b ou PBP1a, mais ne nécessite pas d'autres composants de l'élongasome (RodA, PBP2, MreB) et du divisome (FtsA, FtsEX, FtsK, FtsQ,) (Potluri *et al.*, 2012). Des données biochimiques montrent que ZipA stimule l'activité GTase de PBP1a et PBP1b, participant au processus de synthèse du PG pré-septal (Pazos *et al.*, 2018).

1.2.2.3 Le divisome d'*Escherichia coli*

Le divisome d'*E. coli* est une machinerie multiprotéique/multienzymatique constituée d'au moins 30 protéines distinctes dont 12 sont essentielles : FtsZ, FtsA, ZipA, FtsE, FtsX, FtsB, FtsL, FtsQ, FtsK, FtsW, FtsI (PBP3), FtsN (**Figure I.20**) (de Boer, 2010). L'absence d'une de ces protéines induit généralement une filamentation de la bactérie avec parfois plusieurs nucléoides et conduit éventuellement à la mort de la bactérie (de Boer, 2010 ; Lutkenhaus *et al.*, 2012 ; Egan & Vollmer, 2013). Les autres protéines se localisant au site de division, dites accessoires, sont individuellement non essentielles. On retrouve essentiellement : AmiA, AmiB, AmiC, NlpD, EnvC, DedD, DamX, RlpA, PBP1b, ZapA, ZapB, ZapC, ZapD, ZapE, Pal, TolC, TolA, TolQ, TolR, LpoB, CpoB (de Boer, 2010). Ces protéines seront discutées dans ce chapitre. Le recrutement des différents constituants du divisome est réalisé de manière séquentielle, interdépendante et impliquant de nombreuses interactions protéine-protéine (Karimova *et al.*, 2005). L'assemblage du divisome se déroule en deux phases séparées dans le temps : la phase précoce et la phase tardive (Aarsman *et al.*, 2005).

La première phase, ou phase précoce, consiste à l'établissement de « l'anneau » FtsZ, précisément au milieu du grand axe de la bactérie, et des protéines accessoires (protéines Zaps) associées (Lutkenhaus *et al.*, 2012). Après la formation de l'anneau FtsZ, il survient un temps d'environ un demi-cycle de division avant qu'une seconde vague d'autres protéines (phase tardive) soient recrutées, parmi lesquelles : FtsE/FtsX, FtsK, FtsQ/FtsL/FtsB, FtsW/FtsI (PBP3) et finalement FtsN (Aarsman *et al.*, 2005). Ces dernières protéines sont toutes localisées dans la membrane cytoplasmique et sont recrutées de manière hiérarchique pour initier la synthèse du septum et la constriction cellulaire. La complexité du divisome reflète le nombre important de tâches que celui-ci doit accomplir : (i) l'invagination de la membrane cytoplasmique (ii) la synthèse du peptidoglycane septal (sPG) (iii) la séparation précise de cette couche de sPG pour former les deux nouveaux pôles des cellules filles (iv) la coordination de l'invagination de la membrane externe avec la membrane cytoplasmique (Liu *et al.*, 2015). Cette dernière tâche fait intervenir le système Pal-TolC situé au niveau du site de constriction de la cellule. Ce système comprend au moins

cinq protéines : trois protéines ancrées dans la membrane cytoplasmique (TolA, TolQ, TolR), une protéine périplasmique (TolB) et une lipoprotéine (Pal) (Gerding *et al.*, 2007).

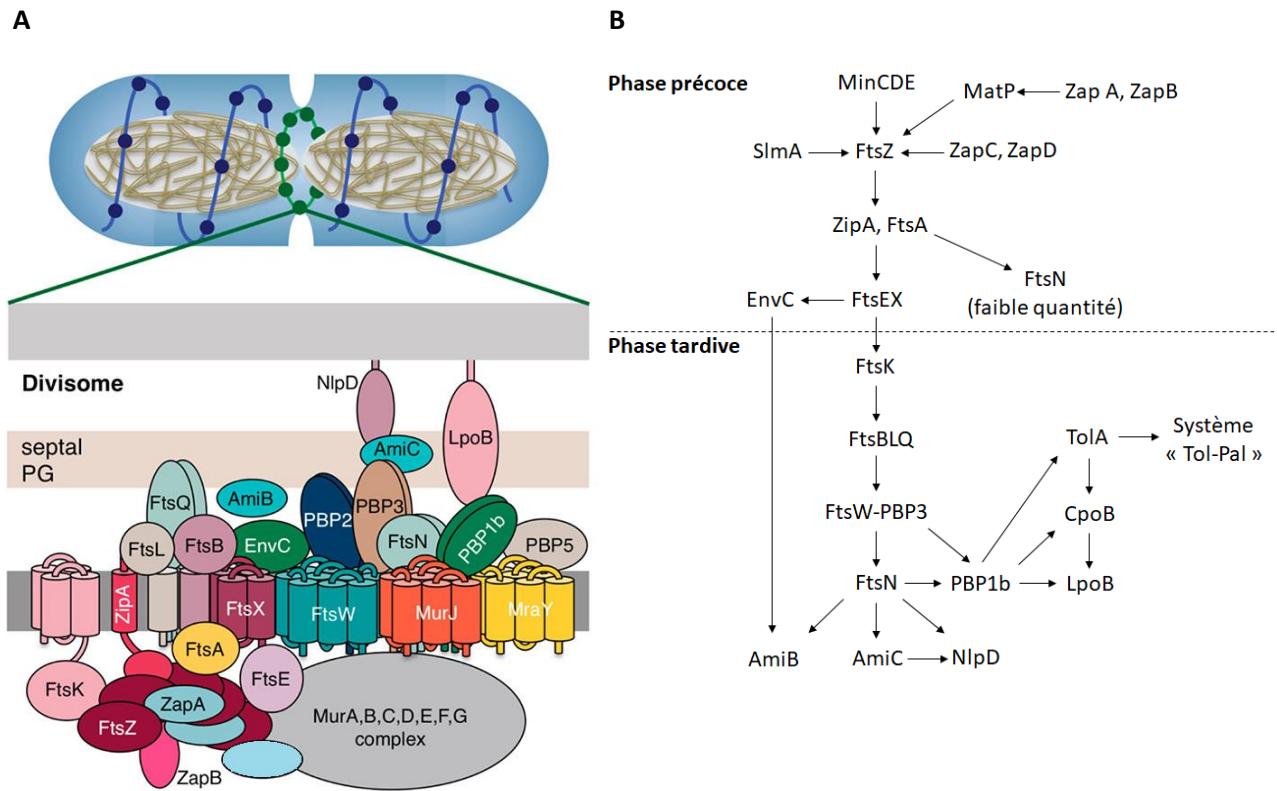


Figure I.22 : Vue générale des principaux constituants du divisome d'*E. coli* et interdépendance entre ces constituants.

- Représentation schématique des protéines de l'élongasome chez *E. coli* (voir texte) (Dik *et al.*, 2018).
- Schéma de recrutement hiérarchique et interdépendant des constituants du divisome. L'assemblage du divisome s'effectue en deux phases temporellement séparées (précoce et tardive). Les flèches représentent généralement des interactions directes ou indirectes (voir détails dans le texte ci-après).

Protéines du divisome recrutées lors de la phase précoce

FtsZ est la première protéine qui se localise précisément, grâce à différents systèmes de régulation, au futur site de division et constitue, en outre, la structure de base qui servira d'ancre pour le recrutement séquentiel des autres constituants du divisome (Lutkenhaus *et al.*, 2012 ; Bisson-Filho *et al.*, 2017 ; Yang *et al.*, 2017 ; Wang *et al.*, 2019). Néanmoins, il semblerait que FtsZ sert plus de marqueur initial au recrutement des autres constituants du divisome plutôt que de structure supportant l'entièreté du divisome tout au long de la division, étant donné que la localisation de FtsZ ne coïncide pas parfaitement avec celle de protéines plus tardives comme FtsN (Söderström *et al.*, 2018 ; McQuillen & Xiao, 2020).

1.2.2.3.1 L'anneau FtsZ

FtsZ (40 kDa) est une protéine globulaire, homologue à la tubuline, formant des protofilaments, et composée de deux sous-domaines se repliant indépendamment et séparés par l'hélice $\alpha 7$ à l'interface entre les deux domaines (**Figure I.23.A**) (Löwe & Amos, 1998 ; Oliva *et al.*, 2004 ; Osawa & Erickson, 2005 ; Matsui *et al.*, 2012 ; Wagstaff *et al.*, 2017). Le domaine N-terminal a la structure caractéristique des protéines liant le GTP et est en interaction avec le domaine C-terminal lors de la formation d'un protofilament (Erickson *et al.*, 2010). En amont du domaine N-terminal, on retrouve une courte région désordonnée de 10 acides aminés (Erickson *et al.*, 2010). Le domaine C-terminal contient notamment la région impliquée dans le processus d'hydrolyse du GTP (voir ci-après) (Erickson *et al.*, 2010). À la suite de ce domaine C-terminal, on retrouve environ 50 acides aminés qui forment une région non structurée, flexible et très peu conservée entre espèces bactériennes (Ohashi *et al.*, 2007 ; Erickson *et al.*, 2010). Enfin les 17 acides aminés C-terminaux sont très conservés et forment une structure en brin β – hélice α impliquée notamment dans la liaison de FtsA et ZipA (voir point **1.2.2.3.1.2**) (Mosyak *et al.*, 2000).

Lors de l'assemblage des monomères en protofilaments, le GTP du domaine N-terminal est mis à proximité de trois résidus hautement conservés (N207, D209, et D212, le résidu catalytique) présents dans la boucle T7 qui joue un rôle déterminant dans l'hydrolyse du GTP en GDP (Scheffers *et al.*, 2002 ; Redick *et al.*, 2005). En effet, FtsZ sous forme monomérique hydrolyse très lentement le GTP. Par contre, sous forme filament, la boucle T7 joue le rôle d'activateur de l'hydrolyse du GTP (Nogales *et al.*, 1998 ; Scheffers *et al.*, 2002 ; Redick *et al.*, 2005 ; Osawa & Erickson, 2005). Différentes études ont déterminé que l'échange du nucléotide ne se produit que lorsque la poche de liaison du GTP est exposée au solvant, c'est-à-dire à l'extrémité dite positive du protofilament ou au niveau des monomères libres (Chen & Erickson, 2009 ; Huecas *et al.*, 2007). Cependant, ni l'hydrolyse du GTP, ni même la liaison de ce GTP ne sont requises pour l'assemblage à proprement parler des protofilaments (Chen & Erickson, 2009 ; Chen *et al.*, 2005 ; Huecas *et al.*, 2007). Par ailleurs, on sait que les unités FtsZ-GDP peuvent s'assembler, mais moins fortement que les FtsZ-GTP (Huecas *et al.*, 2007 ; Sossong *et al.*, 1999). Dès lors, il avait été suggéré que l'hydrolyse du GTP pourrait fournir un moyen de déstabiliser les filaments conduisant à un recyclage constant des sous-unités FtsZ (Huecas *et al.*, 2004). Néanmoins, chez *E. coli*, l'activité GTPase de FtsZ s'est révélée non essentielle à la division et ne semble pas dicter le rythme de constriction, menant à de nombreux questionnements quant au rôle biologique de l'activité GTPase de FtsZ (Bi & Lutkenhaus, 1990 ; Coltharp *et al.*, 2016). Finalement, la réponse a été donnée sur base d'études de la dynamique de FtsZ par microscopie de fluorescence à haute résolution chez des mutants dans la boucle T7. Les filaments de FtsZ s'assemblent et se désassemblent, mais le nombre d'unités par filament est stable (Yang *et al.*, 2017). Cette dynamique est intimement liée à l'activité GTPase de FtsZ étant donné que des mutants dans la boucle T7 voient la dynamique de leurs protofilaments FtsZ fortement réduite (Yang *et al.*, 2017). En réalité, les protofilaments de FtsZ montrent un mouvement sur la périphérie du site de division. Cette dynamique de FtsZ a été attribué à un mécanisme dit de « tapis roulant » (ou « treadmilling »), observé *in vivo* et *in vitro* : ceci signifie que le mouvement directionnel apparent des protofilaments de FtsZ s'effectue par polymérisation à l'avant et dépolymérisation à l'arrière, préservant la quantité totale de monomère du protofilament (**Figure I.23.B**) (Loose & Mitchison, 2014 ; Yang *et al.*, 2017 ; Ramirez-Diaz *et al.*, 2018). À noter que ces protofilaments s'organisent comme des « patchs », c'est à dire des assemblages discontinus sur la périphérie au site de division et non comme un véritable anneau continu (Yang *et al.*, 2017 ; Bisson-Filho *et al.*, 2017). La dynamique étant observée chez différents organismes *in vivo* et *in vitro* suggère qu'il s'agit d'une propriété intrinsèque des filaments de FtsZ (Wagstaff *et al.*, 2017). Cette dynamique de FtsZ affecte la distribution spatio-temporelle de la synthèse du PG, mais pas le rythme de synthèse. Dans le même ordre d'idée, il n'existe pas de corrélation entre la dynamique de FtsZ

et le rythme de fermeture du septum chez *E. coli*. En résumé, la dynamique de FtsZ est GTP dépendante et organise spatio-temporellement la machinerie de synthèse du sPG (Yang *et al.*, 2017 ; Wagstaff *et al.*, 2017).

Des études structurales de FtsZ, de différentes espèces, ont permis de mettre en évidence deux conformations possibles de FtsZ (Matsui *et al.*, 2012 & 2014 ; Elsen *et al.*, 2012). En effet, il existe la forme fermée (ou relâchée) correspondant à l'état monomérique de FtsZ et la forme ouverte (ou tendue), où une rotation dans le domaine C-terminal se manifeste, correspondant au FtsZ des protofilaments (Wagstaff *et al.*, 2017). L'existence de ces deux conformations explique la concentration critique en FtsZ permettant le début de la polymérisation et la coopérativité dans l'assemblage du filament (Wagstaff *et al.*, 2017). Ces deux conformations donnent également un mécanisme possible expliquant la dynamique de FtsZ : la forme fermée de FtsZ possède une interface incomplète associée à l'état monomérique de FtsZ, tandis que la forme ouverte a une interface plus complète qui lui permet de s'adapter au sein de protofilaments (Wagstaff *et al.*, 2017). Cette différence d'interfaces entre les conformations fermées et ouvertes entraînerait des taux d'additions et de relargage des sous-unités distincts de chaque côté du filament, l'extrémité possédant un taux de croissance supérieur à l'autre correspond à l'extrémité positive (**Figure I.23.B**) (Wagstaff *et al.*, 2017).

Plusieurs questions concernant FtsZ restent encore soumises à débat. Tout d'abord, des données montrent que les filaments FtsZ forment des structures monocouches de filaments alors que d'autres données suggèrent des structures multicouches, mais probablement sans interaction latérale directe entre protofilaments (Briegel *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2007 ; Szwedziak *et al.*, 2014 ; Yao *et al.*, 2017). De ces nombreuses données se dégage une vue dans laquelle l'anneau FtsZ est composé de filaments discontinus rassemblés sur une largeur de 80 à 100 nm, formant probablement une monocouche et associés de manière lâche les uns aux autres via des facteurs protéiques (voir point **1.2.2.3.1.2**). Un autre débat concerne l'éventuelle fonction de l'anneau FtsZ dans la génération d'une force mécanique, dépendante de l'hydrolyse du GTP, entraînant l'invagination de la membrane cytoplasmique par courbure des filaments, pendant la division (Erickson *et al.*, 2010 ; Erickson 2017 ; Söderström *et al.*, 2016 ; Xiao & Goley, 2016). Il se pourrait que le processus d'invagination implique à la fois des forces induites par FtsZ en plus de la force générée par la synthèse du sPG. Des simulations récentes suggèrent qu'une force constrictive serait nécessaire pour accompagner la synthèse du sPG (Nguyen *et al.*, 2019). D'autres travaux proposent au contraire qu'aucune force supplémentaire à celle de la synthèse du sPG n'est requise pour initier la constriction (Erickson, 2017 ; Söderström *et al.*, 2016).

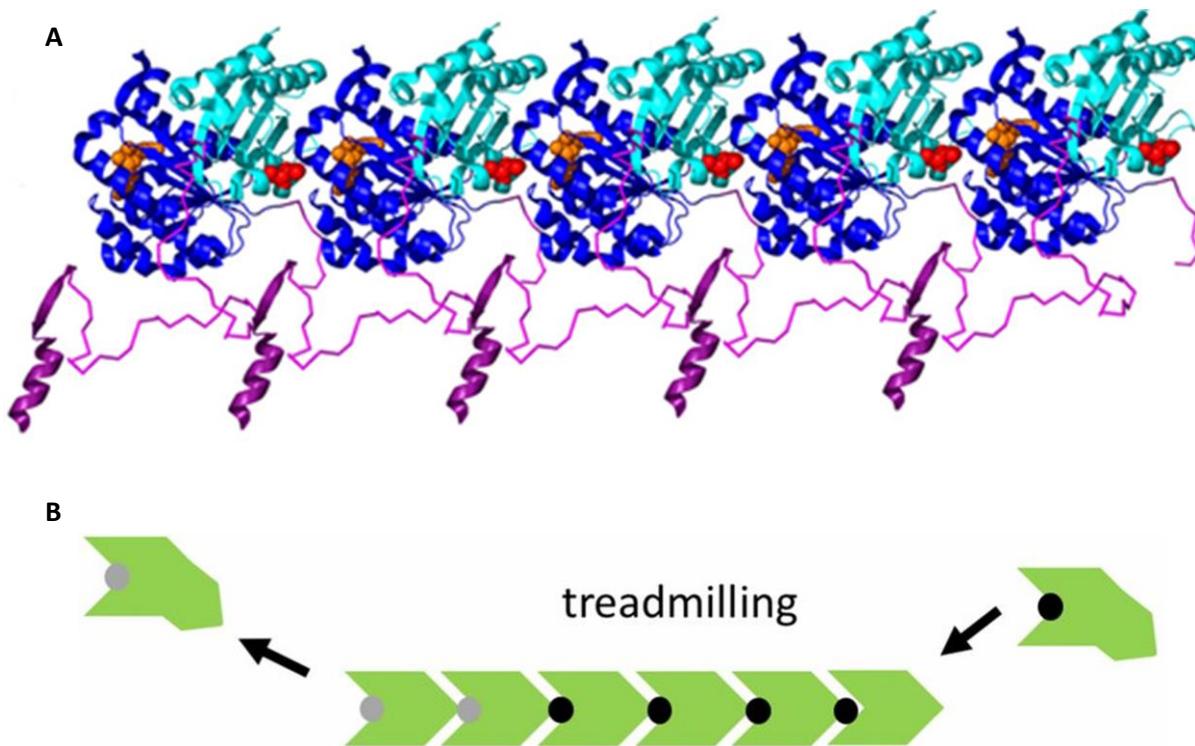


Figure I.23 : Protofilament de FtsZ.

- A. Structure moléculaire de la protéine FtsZ (*P. aeruginosa*) sous forme de protofilament. Le domaine N-terminal (en bleu) et le domaine C-terminal (en turquoise). Le GDP est représenté en orange et le résidu D212 (numérotation d'*E. coli*) est représenté en rouge. En violet est représentée l'extrémité C-terminale avec la région terminale conservée structurée (Erickson *et al.*, 2010).
- B. Vue schématique du mécanisme de « tapis roulant » (« treadmilling »). Le GTP et le GDP sont représentés respectivement en noir et en gris (Du *et al.*, 2018).

1.2.2.3.1.1 Positionnement de l'anneau FtsZ

La position de l'anneau FtsZ est soumise à plusieurs systèmes de régulation permettant sa localisation précise au milieu de la cellule : le système des protéines Mins, l'occlusion par le nucleoïde et le « Ter-linkage ».

Le système MinCDE

Le système de régulation composé des protéines MinCDE a été identifié sur base de mutants donnant naissance à des « mini-cellules » où la formation du septum se réalisait à proximité des pôles (de Boer *et al.*, 1989). En résumé il en a été conclu que MinC et MinD inhibent la division cellulaire et MinE la favorise au niveau des pôles (Boer *et al.*, 1989). La particularité de ce système est l'oscillation de ces protéines d'un pôle à l'autre de la cellule générant un gradient de protéine Mins des pôles vers le centre de la cellule favorisant ainsi la formation du septum au milieu de la cellule (Figure I.24) (Raskin & de Boer, 1999 ; Hu & Lutkenhaus, 1999).

MinD est une ATPase dimérique qui possède deux motifs switch I et II participant à la liaison et l'hydrolyse de l'ATP (Hayashi *et al.*, 2001 ; Cordell & Löwe, 2001a). Ces motifs semblent également intervenir dans la liaison et l'activation de MinC. La protéine liée à l'ADP est monomérique, mais la liaison de l'ATP dimérisé la protéine avec notamment la lysine 11 d'un monomère qui interagit avec l'ATP d'un autre monomère (Wu *et al.*, 2011 ; Zhou *et al.*, 2005). Le C-terminal de MinD contient une hélice amphipathique qui possède une affinité assez faible pour la membrane, mais le dimère MinD augmente l'affinité de la protéine pour la membrane et forme une monocouche associée à cette dernière de manière coopérative (Hayashi *et al.*, 2001 ; Cordell & Löwe, 2001a ; Wu *et al.*, 2011 ; Ramm *et al.*, 2018 ; Miyagi *et al.*, 2018). Le détachement de la membrane nécessite l'hydrolyse de l'ATP, cependant l'activité ATPase intrinsèque de MinD est faible et nécessite une activation par MinE (Hu & Lutkenhaus, 2001 ; Lackner *et al.*, 2003).

MinE est une petite protéine composée d'un domaine N-terminal suffisant pour supprimer l'activité inhibitrice de MinCD et un domaine C-terminal intervenant dans la dimérisation de la protéine (King *et al.*, 2000). Le domaine N-terminal contient une hélice amphipathique liant la membrane et une hélice α liant MinD qui ne se forme que suite à l'interaction avec MinD (Park *et al.*, 2011 ; Ma *et al.*, 2003). MinE existe donc sous une forme dimérique diffusible dans le cytoplasme jusqu'à ce qu'elle interagisse avec MinD, lié à l'ATP et associé à la membrane, permettant un changement de conformation dans MinE qui libère l'hélice amphipathique et surtout l'hélice α activant l'activité ATPase de MinD, qui alors monomérise et se détache de la membrane (Ayed *et al.*, 2017 ; Lackner *et al.*, 2003 ; Hu & Lutkenhaus, 2001 ; Park *et al.*, 2012). MinE peut alors rester attaché à la membrane et agir sur d'autres dimères, on parle de persistance membranaire, puis enfin se dissocie de la membrane sous forme de monomère diffusible (Loose *et al.*, 2011 ; Park *et al.*, 2012 ; Ayed *et al.*, 2017).

MinC suit la dynamique de MinDE et est le véritable effecteur du système Min, car il s'agit de l'inhibiteur de la formation de l'anneau FtsZ. MinC est composé de deux domaines, participant à l'inhibition, reliés par un « linker » et forme un dimère (Cordell & Löwe, 2001b ; Hu & Lutkenhaus, 2000). Le domaine C-terminal contient le site de dimérisation et le motif conservé RSGQ interagissant avec la forme dimérique de MinD ancrée à la membrane (Zhou *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2017 ; Hu & Lutkenhaus, 1999 ; Lackner *et al.*, 2003, Park *et al.*, 2012 ; Hu *et al.*, 2003). Les sites de liaison de MinC (motifs RSCG) et de MinE (hélice α) à MinD se superposent (Wu *et al.*, 2011 ; Yang *et al.*, 2017 ; Ma *et al.*, 2004), dès lors, une compétition s'instaure, permettant à MinE de déplacer MinC lié à MinD (Lackner *et al.*, 2003 ; Hu *et al.*, 2003). Dans la dynamique d'oscillation, MinE est vraiment le moteur, sans MinE, il n'y a pas d'oscillation et les cellules filamentent, car MinCD se localisera partout au niveau à la membrane empêchant l'anneau FtsZ de se former (**Figure I.24**) (Raskin & de Boer, 1999 ; Ma *et al.*, 2003). Un autre facteur intervenant dans la dynamique des protéines Mins est la composition de la membrane. Il a été démontré que l'oscillation de MinDE nécessite des charges négatives au niveau de la membrane (Mileykovskaya *et al.*, 2003, Renner & Weibel, 2012 ; Vecchiarelli *et al.*, 2014). Or, des lipides anioniques, telle la cardiolipine, se concentrent au pôle et puis au septum tout comme MinD (Vecchiarelli *et al.*, 2014).

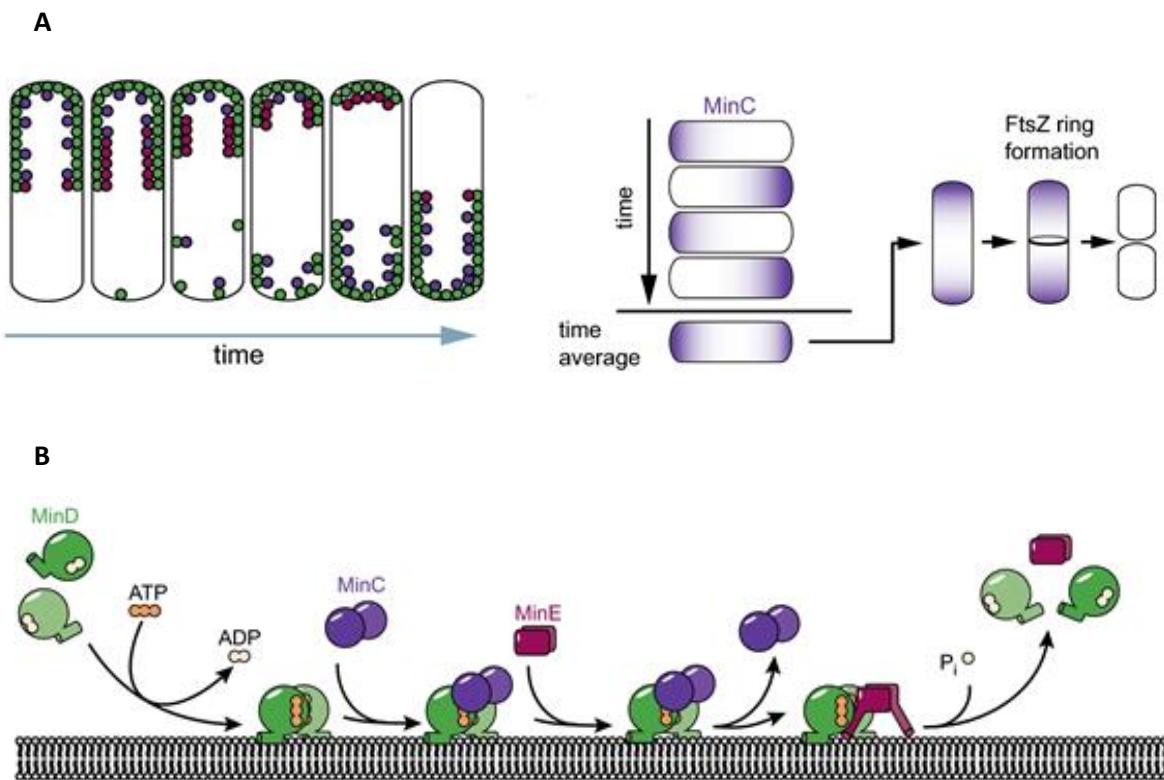


Figure I.24 : Mécanisme de positionnement de l'anneau FtsZ par le système des protéines Mins.

- A. Oscillation des protéines Mins d'un pôle à l'autre générant un gradient de concentration à partir des pôles avec une concentration minimum au site de division. MinD (en vert), MinE (en rose) et MinC (en mauve) (voir texte ci-dessus).
- B. Représentation schématique de l'interdépendance des protéines MinCDE (voir texte ci-dessus) (Ramm *et al.*, 2019).

L'occlusion par le nucleoïde

Le second mécanisme de positionnement de FtsZ est un mécanisme participant au partage égal des chromosomes entre les deux cellules filles. Le chromosome d'*E. coli* est composé de quatre macro-domaines (MDs) : Ori (contenant l'origine de réPLICATION), Ter (contenant le terminateur), et deux domaines gauche et droit (Niki *et al.*, 2000 ; Valens *et al.*, 2004). Chez *E. coli*, la protéine SlmA a été identifiée comme jouant un rôle dans le processus d'occlusion par le nucleoïde en s'associant au chromosome et empêchant la formation du septum à cet endroit (**Figure I.25**) (Bernhardt & de Boer 2005). SlmA est une protéine de la famille TetR, composé de neuf hélices α avec les deux hélices N-terminales formant un domaine hélice-boucle-hélice, de liaison à l'ADN. Il a été démontré que la protéine SlmA interagit directement avec l'anneau FtsZ (Bernhardt & de Boer 2005). Au niveau du chromosome, SlmA se lie à des séquences palindromiques (SBS) retrouvées dans tous les MDs sauf dans la région Ter (Tonthat *et al.*, 2011 ; Cho *et al.*, 2011). Quand SlmA est lié à l'ADN, elle impacte négativement la formation de protofilaments de FtsZ (Cho *et al.* 2011 ; Du & Lutkenhaus 2014). Ce système agit donc comme synchronisateur entre la ségrégation du chromosome et la division cellulaire en permettant à l'anneau FtsZ de se former uniquement près de la région Ter, se répliquant en dernier au milieu de la cellule. Des données biochimiques et structurales indiquent que SlmA se lie aux SBS sous forme de

tétramère pour exercer sa fonction sur FtsZ (Cuthbertson and Nodwell 2013 ; Tonthat *et al.*, 2013). Des études ont montré l'importance de la séquence C-terminale conservée de FtsZ pour l'interaction avec SlmA (Du & Lutkenhaus 2014 ; Du *et al.*, 2015). Quant à SlmA, la région entre l'hélice $\alpha 4$ et $\alpha 5$ interviendrait dans l'interaction avec FtsZ (Cho & Bernhardt 2013).

Le « Ter Linkage »

Contrairement aux deux premiers systèmes qui exercent une action inhibitrice sur la formation des protofilaments de FtsZ, le « Ter linkage » promeut l'assemblage de la machinerie de division à proximité de la région terminale de réPLICATION du chromosome (**Figure I.25**) (Männik & Bailey, 2015). Ce système est dirigé par la protéine MatP se liant à la région Ter du chromosome d'*E. coli* au niveau des séquences *matS* (23 sites), uniquement retrouvées dans cette région (Mercier *et al.*, 2008). MatP contient un domaine de liaison à l'ADN composé de quatre hélices α , une région de dimérisation, et d'une région C-terminale permettant la formation de tétramères permettant de relier deux sites *matS* distants (Dupaigne *et al.*, 2012). L'ancrage de la région Ter aux protofilaments de FtsZ est réalisé par l'interaction entre la région C-terminale de MatP avec la protéine ZapB associée à FtsZ via ZapA (voir point **1.2.2.3.1.2**) (Galli & Gerdes, 2010 ; Espeli *et al.*, 2012). On a donc un système MatP-ZapB-ZapA-FtsZ qui serait chargé de préserver la position du chromosome par rapport au divisome après la formation de l'anneau FtsZ (Männik & Bailey, 2015). Par ailleurs il a été montré que l'organisation de la région Ter et son déplacement progressif vers le centre de la cellule dépend de MatP qui déplace le complexe MukBEF, un complexe organisateur de la région Ter du chromosome (Nolivos *et al.*, 2016). Enfin, il a récemment été montré que MatP interagit avec la membrane, mais il n'y aurait pas de complexes ternaires ADN-MatP-membrane, suggérant une exclusion mutuelle des deux ligands vis-à-vis de MatP (Monterroso *et al.*, 2019). Le rôle de la liaison de MatP à la membrane n'est pas clairement établi, mais une explication pourrait être la suivante : lors de la déconcaténation du chromosome et la fermeture du septum, la présence de MatP associée à la région Ter n'est plus souhaitée, dès lors, sa fixation à la membrane pourrait empêcher une refixation immédiate à la région Ter (Monterroso *et al.*, 2019).

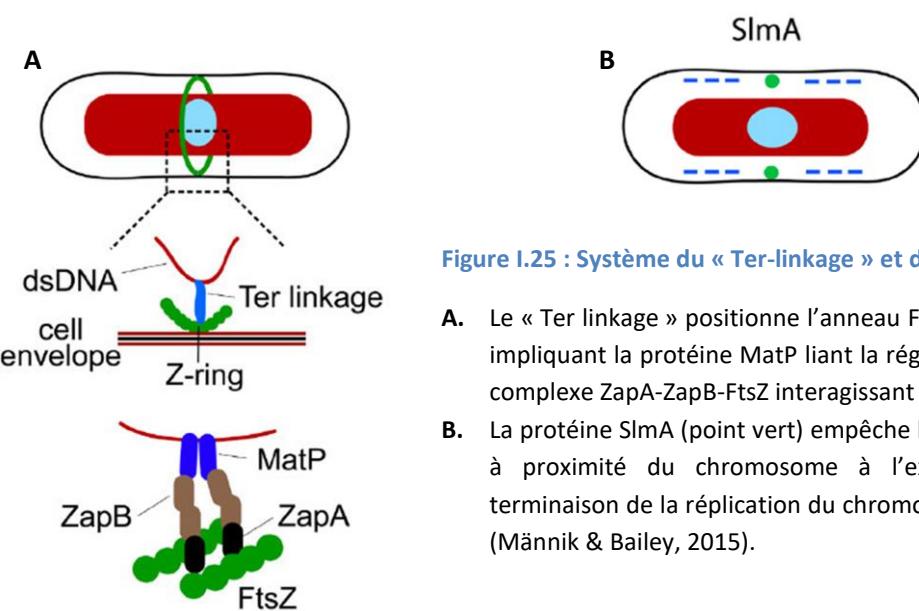


Figure I.25 : Système du « Ter-linkage » et d'occlusion par le nucleoïde.

- Le « Ter linkage » positionne l'anneau FtsZ par un mécanisme positif impliquant la protéine MatP liant la région ter du chromosome et le complexe ZapA-ZapB-FtsZ interagissant avec MatP via ZapB.
- La protéine SlmA (point vert) empêche la formation de l'anneau FtsZ à proximité du chromosome à l'exception de la région de terminaison de la réPLICATION du chromosome, au milieu de la cellule (Männik & Bailey, 2015).

1.2.2.3.1.2 Ancrage et stabilisation de l'anneau FtsZ

La structure en anneau dynamique formée par FtsZ est recrutée à la membrane grâce à deux protéines : FtsA et ZipA toutes deux individuellement indispensables au recrutement de FtsZ et à la division cellulaire (Pichoff & Lutkenhaus, 2002). Par ailleurs d'autres protéines associées à FtsZ sont impliquées notamment dans l'organisation et la stabilisation de cet anneau en permettant des interactions latérales entre les protofilaments de FtsZ : ce sont les protéines Zaps (« Z-associated proteins ») (Caldas *et al.*, 2019 ; Schumacher *et al.*, 2017).

Les protéines FtsA et ZipA

FtsA (45 kDa) est une protéine cytoplasmique hautement conservée, homologue de l'actine, capable de former des polymères (Van den Ent & Löwe, 2000 ; Szwedziak *et al.*, 2012 ; Fujita *et al.*, 2014). Cette protéine possède 2 domaines (I et II) à l'interface desquels se dessine le site de liaison de l'ATP (Van den Ent & Löwe, 2000 ; Fujita *et al.*, 2014). Chaque domaine est divisé en deux sous-domaines (A et B). Les deux plus gros sous-domaines, IA et IIA, sont similaires et sont composés d'un feuillett β à cinq brins entourés de trois hélices α (Van den Ent & Löwe, 2000 ; Fujita *et al.*, 2014). Les deux autres sous-domaines, IC et IIB, sont plus petits et en opposition dans la structure. Le domaine IC contient une hélice α adjacente à un feuillett β à trois brins antiparallèles (Van den Ent & Löwe, 2000 ; Fujita *et al.*, 2014). Ce domaine interagit avec la portion cytoplasmique d'une autre protéine essentielle à la division : FtsN (Busiek *et al.*, 2012 ; Pichoff *et al.*, 2018) (voir point 1.2.2.3.7). Le domaine IIB contient les hélices α_6 et α_7 impliquées dans la liaison de l'ATP, deux brins β antiparallèles et la partie N-terminale de l'hélice α_8 , la partie C-terminale de cette hélice étant comprise dans le domaine IIA (Van den Ent & Löwe, 2000 ; Fujita *et al.*, 2014). En C-terminal de FtsA, on retrouve une hélice α amphipathique essentielle à la fonction de FtsA, permettant l'ancrage de la protéine sur la face interne de la membrane cytoplasmique (**Figure I.26**) (Pichoff & Lutkenhaus, 2005). FtsA ancre à son tour FtsZ à la membrane en interagissant avec la partie C-terminale conservée de FtsZ via son domaine IIB (Szwedziak *et al.*, 2012). Chez *S. pneumoniae*, des données *in vitro* ont démontré que la polymérisation de FtsA est directionnelle et que cette polymérisation est facilitée lors de la liaison de la protéine à la membrane : la polymérisation et l'attachement à la membrane dépendant de la liaison de l'ATP suggérant que l'ATP induit un changement conformationnel pour libérer l'hélice amphipathique C-terminale de FtsA qui induirait la polymérisation (Lara *et al.*, 2005 ; Krupka *et al.*, 2012 ; Krupka *et al.*, 2014). Chez *E. coli*, il a par ailleurs été démontré récemment que la liaison de l'ATP par FtsA et son hydrolyse favorisent le remodelage de la membrane et son invagination au moment de la division (Conti *et al.*, 2018). Chez *E. coli*, de nombreuses données *in vivo* montrent que FtsA limite la formation de faisceaux de protofilaments de FtsZ qui eux sont notamment favorisés par les protéines Zaps (Krupka *et al.*, 2017 ; Krupka & Margolin, 2018). *In vitro*, des données suggèrent que la formation de petites structures en anneau de FtsA en interaction avec les protofilaments de FtsZ serait à l'origine de l'effet antagoniste de FtsA sur la formation de faisceaux de protofilaments de FtsZ (Krupka *et al.*, 2017 ; Krupka & Margolin, 2018). Néanmoins les structures en anneau de FtsA n'ont à ce jour pas encore été observées *in vivo* mais l'effet antagoniste de FtsA sur l'assemblage de FtsZ a été observé *in vivo* (Loose & Mitchison, 2014 ; Krupka & Margolin, 2018). En résumé FtsA ancre FtsZ à la membrane et organise les structures formées par les protofilaments de FtsZ.

ZipA (36 kDa) est moins conservé que FtsA et n'est retrouvé que chez les γ -protéobactéries, dont *E. coli* (RayChaudhuri, 1999). Il s'agit d'une protéine membranaire avec une courte portion périplasmique N-terminale, une hélice α transmembranaire et un large domaine cytoplasmique (Moy *et al.*, 2000). Ce

dernier contient une répétition de motifs retrouvés dans les protéines associées aux microtubules (MAPs), une région chargée, une région riche en proline-glutamine (P/Q) et une région C-terminale globulaire composée de trois hélices α et d'un feuillet β avec six brins β antiparallèles (RayChaudhuri 1999 ; Moy *et al.*, 2000). Ce domaine C-terminal est nécessaire et suffisant à l'interaction avec la région C-terminale conservée de FtsZ qui permet l'ancrage de FtsZ à la membrane (**Figure I.26**) (Mosyak *et al.*, 2000; Moy *et al.*, 2000). En outre, cette interaction protège FtsZ d'être dégradé par le complexe ClpXP (Pazos *et al.*, 2013). Comme précédemment mentionné, ZipA en collaboration avec FtsZ est requis pour la synthèse du PG pré-septal au moment de la transition élongation-division (Pazos *et al.*, 2018). Le domaine P/Q est un domaine flexible non structuré et subirait un étirement qui pourrait jouer un rôle dans l'orientation des filaments de FtsZ attaché à la membrane (Erickson, 2001 ; Ohashi *et al.*, 2002 ; Lopez-Montero *et al.*, 2013 ; Lee *et al.*, 2019). FtsA est également important pour stabiliser FtsZ et induire la formation de faisceau de protofilaments de FtsZ plus important (Hale, Rhee and de Boer 2000 ; Pazos *et al.*, 2013). Il est important de noter que contrairement à FtsA, qui recrute uniquement des polymères de FtsZ, ZipA peut recruter des monomères de FtsZ au niveau de la membrane, probablement due à une plus grande affinité de ZipA vis-à-vis de FtsZ : une fois sous forme polymère, l'affinité de FtsZ pour FtsA augmente (Loose and Mitchison 2014). Il faut noter que ZipA, tout comme FtsA, ne semble pas affecter la dynamique « tapis roulant » des protofilaments de FtsZ (Krupka *et al.*, 2018). Enfin, il a été démontré par pontage *in vivo* que ZipA interagit avec l'Hélice α 7 de FtsA (Vega & Margolin, 2019). En interagissant avec FtsA, ZipA favorise l'état monomérique de FtsA ayant dès lors son domaine 1C exposé pour l'interaction avec FtsN (Pichoff *et al.*, 2012 & 2015 ; Vega & Margolin, 2019).

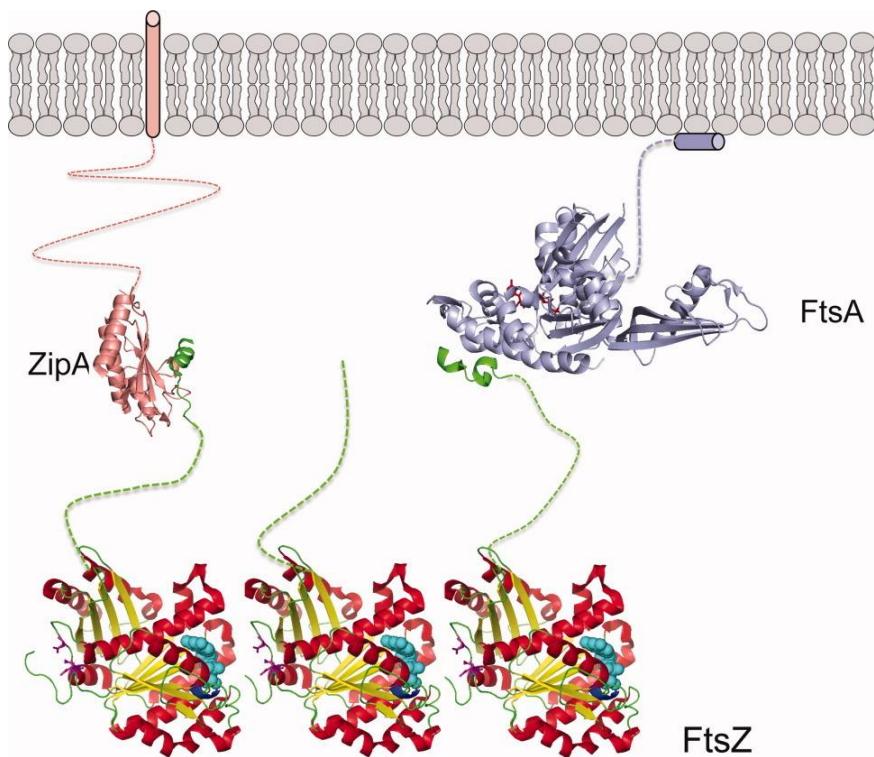


Figure I.26 : Ancre de FtsZ à la membrane par ZipA et FtsA.

Les protofilaments de FtsZ sont ancrés à la membrane par FtsA et ZipA qui interagissent avec la région C-terminale conservée de FtsZ. ZipA possède un segment transmembranaire, une région flexible et un domaine globulaire interagissant avec FtsZ. FtsA est ancré à la membrane via une hélice α amphipathique (Lutkenhaus *et al.*, 2012).

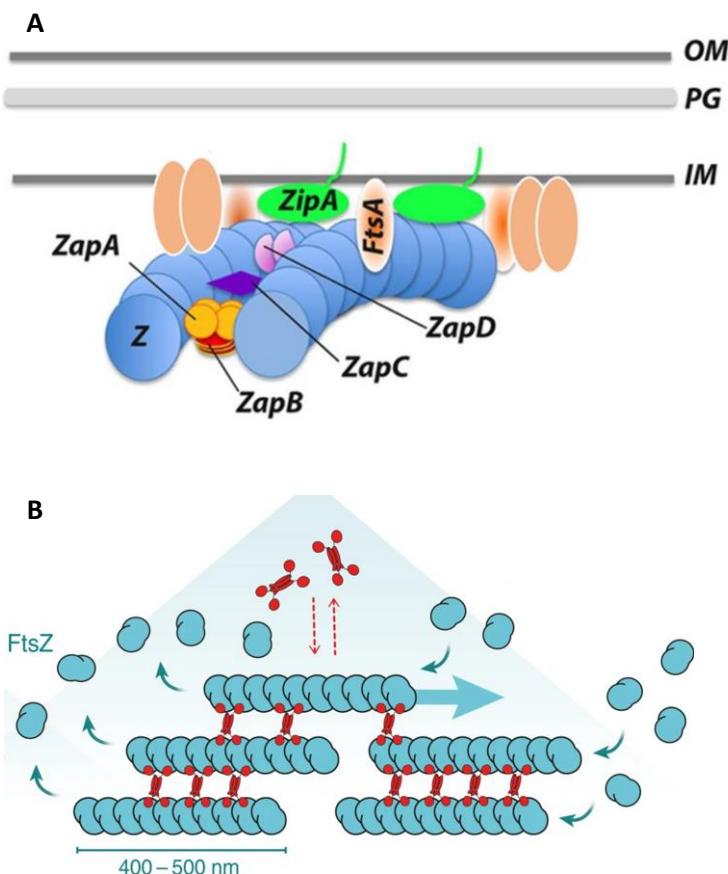
Les protéines Zaps

Les protéines Zaps (ZapABCDE) interagissent et se co-localisent rapidement avec les structures formées par FtsZ qui sont essentielles pour la localisation des protéines Zaps (**Figure I.27**) (Ortiz *et al.*, 2015). Ces protéines n'ont pas de similarité de séquences et sont toutes, individuellement, non essentielles (Durand-Heredia *et al.*, 2012). Seule la délétion d'au moins deux protéines Zaps induit une légère filamentation des bactéries (Durand-Heredia *et al.*, 2012). ZapA est largement répandu au sein du monde bactérien contrairement à ZapBCDE que l'on retrouve uniquement chez les γ -protéobactéries (Ebersbach *et al.*, 2008 ; Hale *et al.*, 2011 ; Marteyn *et al.*, 2014). ZapA est formé d'un domaine globulaire N-terminal et d'un long domaine C-terminal de type « coiled-coil » (Low *et al.*, 2004 ; Roach *et al.*, 2014). ZapA existe sous différents états oligomériques dépendant de la concentration en ZapA (dimère, tétramère, dimère de tétramère), la forme dimérique étant a priori la forme majoritaire *in vivo* bien que la forme tétramérique serait celle en interaction avec FtsZ (Low *et al.*, 2004 ; Roach *et al.*, 2014). Cette forme tétramérique est formée par l'association antiparallèle de deux dimères via des interactions entre les régions C-terminales de ces deux dimères (Low *et al.*, 2004). Des tests de polymérisation *in vitro* montrent que ZapA entrave l'activité GTPase des filaments de FtsZ et les organise en faisceaux de protofilaments (**Figure I.27**) (Gueiros-Filho & Lovesick 2002 ; Low *et al.*, 2004 ; Small *et al.*, 2007). Récemment, des résultats montrent que ZapA augmente l'organisation des protofilaments de FtsZ en liant ces derniers de manière transitoire (Caldas *et al.*, 2019). Par ailleurs, aucun effet de ZapA sur l'orientation, la longueur, ou la dynamique de ces filaments n'a été observé (Caldas *et al.*, 2019). L'interaction ZapA-FtsZ ferait intervenir le domaine globulaire de ZapA, principalement les résidus chargés de l'hélice α contenue dans ce domaine, et une partie du domaine N-terminal de FtsZ (Low *et al.*, 2004 ; Roach *et al.*, 2014 ; Roseboom *et al.*, 2018). Enfin, ZapA, en interaction avec ZapB, participe au positionnement de l'anneau FtsZ en collaboration avec MatP dans le système du « Ter-linkage » (Männik & Bailey, 2015 ; Buss *et al.*, 2017). Il a de plus été montré récemment que la tétramérisation de ZapA est essentielle au recrutement de ZapB au niveau du divisome (Meiresonne & Den Blaauwen, 2020). La fonction de ZapB serait d'ailleurs essentiellement liée au complexe FtsZ-ZapA-ZapB-MatP (Buss *et al.*, 2017). D'ailleurs la localisation de ZapB ne dépend en réalité pas de FtsZ, mais de MatP (Buss *et al.*, 2017). De plus, ZapB n'interagit pas directement avec FtsZ et ne semble pas intervenir directement dans la formation de faisceau de protofilaments de FtsZ (Galli and Gerdes, 2012 ; Buss *et al.*, 2017). La structure cristallographique de ZapB révèle un dimère et ZapB forme également des structures en filament *in vitro* (Ebersbach *et al.*, 2008).

ZapC et ZapD, tout comme ZapA, interagissent directement avec FtsZ et induisent la formation de faisceau de protofilaments par pontage de ces derniers (**Figure I.27**) (Durand-Heredia *et al.*, 2011, Hale *et al.*, 2011, Durand-Heredia *et al.*, 2012). Il a été montré que ZapC inhibe l'activité GTPase de FtsZ, comme ZapA (Hale *et al.*, 2011). La structure de ZapC révèle un monomère formé d'un domaine N-terminal et d'un domaine C-terminal (Schumacher *et al.*, 2016). Le domaine N-terminal est composé, de deux longues hélices α presque perpendiculaires à un feuillet β à trois brins antiparallèles, ainsi que de deux courtes hélices α . Le domaine C-terminal est essentiellement formé de brins β antiparallèles et d'une courte hélice α (Schumacher *et al.*, 2016). Contrairement à ZapAD, ZapC ne forme pas de dimère ce qui suggère que le mécanisme de pontage des protofilaments FtsZ est différent. En effet, on retrouve dans ZapC deux poches adjacentes, une dans le domaine N-terminal et une dans le domaine C-terminal, séparées par 2 boucles (Schumacher *et al.*, 2016). Ces deux poches semblent intervenir dans le pontage : la liaison de la poche N-terminal à un filament reliant un autre filament via la poche C-terminal (Schumacher *et al.*, 2016). ZapC interagirait avec la portion globulaire de FtsZ et ne nécessite pas la présence de sa région C-terminale (Schumacher *et al.*, 2016).

Le monomère de ZapD est constitué d'un domaine N-terminal composé de deux paires de trois hélices α et d'un domaine C-terminal avec sept brins β dont un correspond à l'extrémité N-terminale de la protéine (Roach *et al.*, 2016). Un dimère de ZapD est formé par interaction entre les domaines N-terminaux. ZapD interagit avec la région C-terminale conservée de FtsZ et favorise la formation de faisceaux de filaments de FtsZ suggérant qu'il agit comme ZapAC, en favorisant les interactions latérales entre protofilaments de FtsZ (Durand-Heredia *et al.*, 2012). La région C-terminale de FtsZ est essentielle à l'action de ZapD sur les filaments de FtsZ ainsi qu'à la localisation de ZapD (Huang *et al.*, 2016). Une structure de ZapD en complexe avec la région C-terminale conservée de FtsZ révèle que cette dernière se lie à ZapD dans une poche formée par les hélices α 3 et 8 du domaine N-terminal. Comme ZapD est un dimère, deux régions C-terminales de FtsZ pourraient ainsi être connectées et permettre le pontage de deux protofilaments de FtsZ, comme le ferait ZapA (Schumacher *et al.*, 2017).

Enfin, la protéine ZapE, contrairement aux autres Zaps, agit comme un régulateur de FtsZ en cas de stress thermique ou anoxique (Marteyn *et al.*, 2014). ZapE a une activité ATPase et, par un mécanisme inconnu, réduit la stabilité des structures formées par FtsZ en présence d'ATP (Marteyn *et al.*, 2014). Il faut également noter que contrairement aux autres Zaps qui agissent de manière précoce au niveau de la division, ZapE agit plus tardivement, peut-être en interagissant avec des protéines de la phase tardive de recrutement (Marteyn *et al.*, 2014). Une analyse par SAXS (« Small Angle X-ray Scattering ») révèle une homologie structurale entre ZapE et FtsH, une métalloprotéase ATP-dépendante ciblant FtsZ lors de certains stress (Anilkumar *et al.*, 2001 ; Marteyn *et al.*, 2014 ; Kiran *et al.*, 2009).



1.2.2.3.2 FtsEX

FtsEX appartient à une sous-famille des ABC transporteurs, ce complexe est notamment essentiel pour la stabilité du divisome dans des conditions de faible osmolarité, en interagissant avec d'autres constituants du divisome (Schmidt *et al.*, 2004 ; Reddy, 2007 ; Karimova *et al.*, 2005 ; Corbin *et al.*, 2007). FtsE (24 kDa) est la partie cytoplasmique liant l'ATP et FtsX (39 kDa) représente la composante membranaire avec quatre segments transmembranaires (TMs) et une grande boucle périplasmique, ECL1, entre les deux premiers segments (**Figure I.28**) (De Leeuw *et al.*, 1999 ; Arends *et al.*, 2009). Il a été suggéré que l'hydrolyse de l'ATP au niveau de la région cytoplasmique induirait un changement conformationnel transmis à la boucle périplasmique par l'intermédiaire des domaines TMs, comme c'est le cas chez les ABC transporteurs (Arends *et al.*, 2009). FtsEX fait partie de la même sous-famille que MacB, qui intervient dans un système d'efflux (Greene *et al.*, 2018 ; Crow *et al.*, 2017). Initialement, il avait été conclu que la localisation de FtsE nécessite absolument FtsX, alors que FtsX se localise au site de division, certes moins bien, en absence de FtsE, faisant de FtsX le déterminant de la localisation du complexe (Schmidt *et al.*, 2004 ; Corbin *et al.*, 2007 ; Du *et al.*, 2019). Néanmoins, des études ont montré que FtsE interagit avec FtsZ indépendamment de FtsX, ZipA et FtsA (Corbin *et al.*, 2007 ; Du *et al.*, 2019). La partie C-terminale conservée de FtsZ semble être impliquée dans l'interaction avec la région (61 à 77) de FtsE (Du *et al.*, 2019). En résumé, la localisation de FtsE et FtsX sur l'anneau FtsZ est co-dépendante, car FtsE doit se lier à FtsX avant de se lier à la région C-terminale conservée de FtsZ (Corbin *et al.*, 2007 ; Du *et al.*, 2019). Trois fonctions principales sont associées à FtsEX : le recrutement de protéines plus tardives, la constriction cellulaire ATPase dépendante et enfin l'activation des amidases responsables de la séparation des deux cellules filles, les deux premières fonctions étant vraiment essentielles (Schmidt *et al.*, 2004 ; Yang *et al.*, 2011, Arends *et al.*, 2009 ; Du *et al.*, 2016 & 2019). La fonction la plus conservée, démontrée chez de nombreuses bactéries, est le rôle clé de FtsEX dans la régulation des hydrolases (voir point **1.2.2.3.9**) (Yang *et al.*, 2011 ; Sham *et al.*, 2011 ; Pichoff & Lutkenhaus, 2019).

Il faut noter que l'absence de l'activité ATPase de FtsEX n'empêche pas la localisation de ce complexe ni le recrutement des protéines plus tardives, mais le divisome ainsi formé est inactif, avec un phénotype mimant celui induit par l'inhibition de PBP3 (FtsI), suggérant le rôle de FtsEX, et de l'activité ATPase, dans le contrôle de la synthèse du sPG (Du *et al.*, 2016). Il est important de noter que le rôle de FtsEX dans l'activation du divisome est indépendant de son rôle dans le recrutement des protéines plus tardives ou encore de son rôle d'activation des hydrolases (Busiek *et al.*, 2012 ; Du *et al.*, 2016). Il a été suggéré que FtsEX en interagissant avec FtsA, indépendamment de l'activité ATPase, inhibe la polymérisation de FtsA, se retrouvant en partie sous forme monomérique, une forme favorisant le recrutement ultérieur d'autres protéines constituant le divisome tels que FtsK, FtsN ou encore PBP3 (voir point **1.2.2.4**) (Du & Lutkenhaus, 2017 ; Pichoff *et al.*, 2012 ; Du *et al.*, 2016).

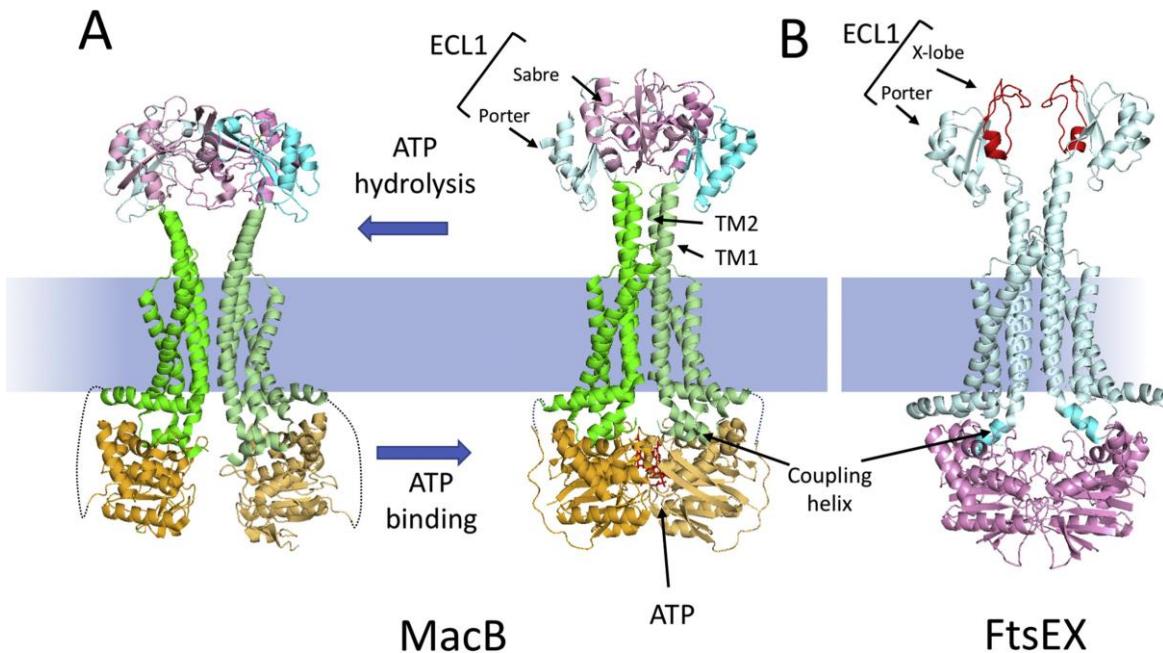


Figure I.28 : Organisation structurale de FtsEX.

- A. Structure du dimère MacB un ABC transporteur de type VII homologue à FtsEX, avec ou sans ATP lié au complexe lié ou non à l'ATP.
- B. Modèle de FtsEX, FtsE (en rose) et FtsX (en turquoise). Le domaine ECL1 possède deux domaines : le domaine « porter » et le domaine « X-lobe » (voir texte ci-avant) (Pichoff et al., 2019).

Protéines du divisome recrutées lors de la phase tardive

Une seconde vague de protéines se localise, presque simultanément au site de division, bien que recrutées hiérarchiquement et de manière interdépendante : ce sont les protéines dites tardives (Aarsman et al., 2005).

1.2.2.3.3 FtsK

FtsK (147 kDa) est une protéine membranaire agissant plus tardivement en coordonnant la division cellulaire avec les derniers stades de la ségrégation chromosomique (Löwe et al., 2008 ; Liu et al., 1998 ; Bigot et al., 2004 ; Pérals et al., 2001 ; Bigot et al., 2007). Le rôle principal est celui de translocase réorganisant activement les chromosomes de manière ATP-dépendante au moment de la division (Begg et al., 1995 ; Männik & Bailey, 2015). Cette protéine possède un domaine C-terminal cytoplasmique (FtsK_C) présentant une structure proche de l'ATPase RecA, capable de former un hexamère autour de l'ADN double brin et de le transloquer après hydrolyse de l'ATP (Massey et al., 2006 ; Saleh et al., 2004 & 2005). FtsK présente également quatre segments transmembranaires constituant la région N-terminale (FtsK_N), interagissant avec différentes protéines, stabilisant le divisome et participant à la division (Draper et al., 1998 ; Yu et al., 1998 ; Di Lallo et al., 2003 ; Geissler & Margolin, 2005). Cette région est séparée du domaine C-terminal par une région « linker » de faible complexité, peu conservée, présentant chez *E. coli* six motifs riches en proline et glutamine (motifs PQ) (Figure I.29) (Dorazi & Dewar, 2000 ; Val et al., 2008).

Le domaine C-terminal de FtsK agit sur la région Ter du chromosome engendrant une importante réorganisation du chromosome, indépendamment de FtsK_N (Dubarry & Barre, 2010 ; Deghorain *et al.*, 2011 ; Stouf *et al.*, 2013). L'activité translocase de FtsK conduit au positionnement du site *dif* (28pb), présent dans la région Ter et au niveau duquel les dimères chromosomiques sont résolus par la recombinase XerCD, au niveau du divisome (Männik & Bailey, 2015). Une fois FtsK localisé au site de division où il forme un baril hexamérique, le positionnement des chromosomes est réalisé par pompage directionnel des deux bras chromosomiques jusqu'à avoir atteint le site *dif* (**Figure I.29**) (Sherratt *et al.*, 2010 ; Bisicchia *et al.*, 2013). FtsK_N est également capable de former un hexamère *in vivo* et *in vitro* en absence de FtsK_C (Bisicchia *et al.*, 2013). Au site de division, le nombre d'hexamères varie de 1 à 7 en fonction du stade d'assemblage du divisome (Bisicchia *et al.*, 2013). L'activité de FtsK a pour effet secondaire de libérer la majorité des protéines liées à l'ADN dans la région transloquée du chromosome, et notamment MatP, dissociant le « Ter-linkage » (Stouf *et al.*, 2013 ; Lee *et al.*, 2014). Il est d'ailleurs probable que le « Ter-linkage » facilite l'activité de FtsK en maintenant la région Ter à proximité du divisome (Männik & Bailey, 2015). En plus de la translocation, FtsKy (portion du domaine C-terminal) interagit avec XerD, activant à la fois le système XerCD qui résout les dimères chromosomiques au niveau du site *dif*, et avec ParC de la topoisomérase IV, déconcaténant les deux chromosomes sœurs (Espeli *et al.*, 2003 ; Keller *et al.*, 2016). Deux régions de FtsK comprises dans le domaine N-terminal (FtsK179–331) et dans le « linker » (FtsK332–641) interagissent fortement avec FtsQ (voir point **1.2.2.3.4**) et un peu avec FtsZ, FtsL et FtsI (Dubarry *et al.*, 2010 ; Grenga *et al.*, 2008). Il a été proposé que le domaine N-terminal serait également impliqué, dans le contrôle de la synthèse du PG (Lesterlin *et al.*, 2008), ce qui permettrait de retarder la fermeture du septum jusqu'à ce que la ségrégation du chromosome soit achevée (Dubarry and Barre, 2010). Le fait que FtsI (PBP3) interagit avec FtsK_N renforce cette idée (Grenga *et al.*, 2008). Par ailleurs, FtsK_N et FtsA interagissent de manière directe (Zou *et al.*, 2017 ; Maggi *et al.*, 2008 ; Berezuk *et al.*, 2020). Il existe un grand nombre de mutations dans FtsA permettant à la cellule de survivre en absence de FtsK, normalement essentielle (Geissler & Margolin 2005 ; Berezuk *et al.*, 2020 ; Bernard *et al.*, 2007 ; Goehring *et al.*, 2007 ; Pichoff *et al.* 2012 ; Herricks *et al.*, 2014). L'interaction entre FtsK_N et FtsA pourrait relier FtsK à la synthèse du PG, FtsK constituant un point de contrôle dans la transition élongation/division : le recrutement direct de FtsK par FtsA pourrait participer à retarder le recrutement complet de FtsN (voir point **1.2.2.3.7**) dans le divisome jusqu'à ce que la phase d'élongation soit terminée et que la division soit prête à se poursuivre (Berezuk *et al.*, 2014 ; Zou *et al.*, 2017 ; Berezuk *et al.*, 2020).

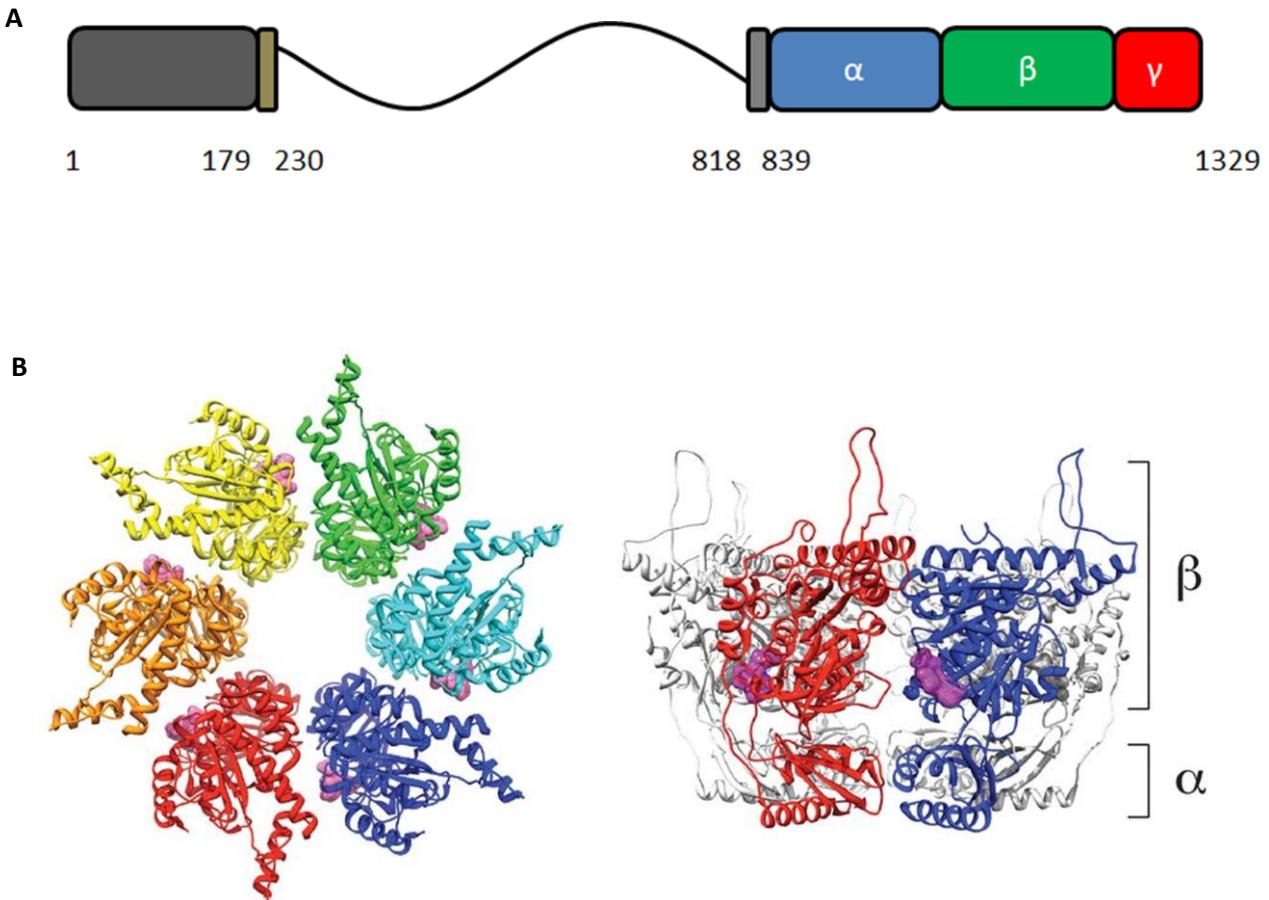


Figure I.29 : Topologie de FtsK et structure du domaine moteur cytoplasmique.

- A. Topologie de la protéine FtsK d'*E. coli* avec la région transmembranaire de quatre hélices α , un long linker riche en proline et glutamine et le domaine moteur cytoplasmique composé de trois domaines α , β et γ . Les numéros indiquent le nombre d'acides aminés des différentes régions de la protéine.
- B. Structure du moteur α/β (*Pseudomonas aeruginosa*), vu par le haut (à gauche) avec le pore où l'ADN pénètre et vu de côté (à droite). L'ADP est représentée en violet (Grainge, 2013).

1.2.2.3.4 FtsBLQ :

FtsQ (31 kDa), bien que n'ayant aucune activité enzymatique, joue un rôle central dans la division en établissant de nombreuses interactions avec différentes protéines de la division, dont FtsB (11 kDa) et FtsL (13 kDa) avec lesquels elle forme le complexe FtsBLQ qui sera recruté par FtsK (Karimova *et al.*, 2005 ; Masson *et al.*, 2009 ; Buddelmeijer & Beckwith, 2004). FtsQ possède une courte portion cytoplasmique, une hélice α transmembranaire et une large portion périplasmique (Van den Ent *et al.*, 2008). Cette dernière est composée d'un domaine α ou domaine POTRA (« Polypeptide-Transport-Associated Domain »), qui joue un rôle dans le recrutement par FtsK et dans l'interaction avec FtsA, FtsK, FtsX, FtsL, FtsB, FtsW, FtsI, FtsN comme démontré par BATCH (« Bacterial Adenylate Cyclase-based Two- Hybrid ») (Di Lallo *et al.*, 2003 ; Karimova *et al.*, 2005 ; Ulisse *et al.*, 2007 ; Van den Ent *et al.*, 2008). La plupart de ces interactions ont été confirmées par co-immunoprecipitation (Buddelmeijer & Beckwith, 2004 ; Ulisse *et al.*, 2007). Le domaine β lui est impliqué dans de nombreuses interactions dont celle avec FtsB et FtsL (Van den Ent *et al.*, 2008).

FtsB et FtsL sont deux petites protéines bitopiques qui pourraient s'associer indépendamment avant leur recrutement au divisome (Robichon *et al.*, 2011 ; Condon *et al.*, 2018). Alors que FtsB présenterait un « linker » flexible entre la portion membranaire et la portion périplasmique, FtsL formerait une hélice α continue (LaPointe *et al.*, 2013 ; Condon *et al.*, 2018). La présence de « leucine zipper » dans leur domaine périplasmique suggère que FtsB et FtsL formeraient un hétérodimère ou tétramère pouvant ensuite interagir avec FtsQ (Robichon *et al.*, 2011 ; Glas *et al.*, 2015 ; Condon *et al.*, 2018). Sur base d'une analyse de co-évolution, des zones d'interactions potentielles entre FtsB et FtsL ont été détectées au sein des régions transmembranaires et entre les régions «coiled-coil» périplasmiques des deux protéines (Condon *et al.*, 2018). De plus, en travaillant avec les formes membranaires complètes de FtsB et FtsL, une interaction directe a été montrée *in vitro* : un complexe 2 : 2 serait le plus probable (Condon *et al.*, 2018). Par ailleurs, il a été montré par des expériences de « pull-down » que FtsB pouvait interagir avec FtsQ en absence de FtsL, mais que FtsL ne pouvait pas interagir fortement avec FtsQ en absence de FtsB (Glas *et al.*, 2015). Deux zones d'interactions entre FtsBL et FtsQ ont été identifiées : une zone dans le domaine POTRA à proximité du résidu R75 pour l'interaction avec FtsL et une région correspondant à la région distale du domaine β à proximité du résidu Y248, pour l'interaction avec FtsB (van den Berg van Saparoea *et al.*, 2013). Sur base des régions périplasmiques solubles, les complexes FtsQB, FtsQL (avec association-dissociation rapide) et FtsBLQ ont été confirmée, mais le complexe FtsBL n'a pas pu être détecté, confirmant l'importance prépondérante des segments transmembranaires dans la formation de ce complexe (Condon *et al.*, 2018 ; Kureisaite-Ciziene *et al.*, 2018). Deux structures entre la région périplasmique de FtsB et de FtsQ révèlent que la région de FtsB comprise entre les résidus 64 et 87 qui forme une hélice α et un brin β relié par une boucle interagit avec la région β de FtsQ à proximité du résidu Y248, comme précédemment prédit (**Figure I.30**) (van den Berg van Saparoea *et al.*, 2013 ; Choi *et al.*, 2018 ; Kureisaite-Ciziene *et al.*, 2018). Le reste de FtsB n'est pas présent dans la structure bien qu'une autre structure montre que FtsB se structure en hélice α en amont du résidu 64 (LaPointe *et al.*, 2013). La région structurée 64-87 de FtsB est nécessaire et suffisante pour l'interaction avec FtsQ (Kureisaite-Ciziene *et al.*, 2018). Des mutations dans FtsQ impliquées dans l'interaction avec cette région de FtsB montrent l'importance de cette interaction pour le fonctionnement du complexe au sein du divisome (Kureisaite-Ciziene *et al.*, 2018). Concernant l'état oligomérique des protéines FtsQ, FtsL, FtsB ainsi que des complexes formés par ces protéines, différentes études montrent des résultats, parfois contradictoires. Il semblerait néanmoins que la forme soluble de FtsQ existe sous forme monomérique et que FtsB par son interaction favoriserait la dimérisation du complexe FtsBQ bien qu'il n'est pas exclu que la forme complète de FtsQ puisse se dimériser seule (Karimova *et al.*, 2005 ; Ulisse *et al.*, 2007 ; Choi *et al.*, 2018 ; Kureisaite-Ciziene *et al.*, 2018). Le complexe FtsBLQ pourrait lui exister sous une forme hétérotrimérique à faible concentration (complexe 1 : 1 : 1) ou hétérohexamérique à plus haute concentration (2 : 2 : 2) lorsque l'on s'intéresse aux seules portions périplasmiques de ces protéines (Egan & Vollmer, 2015). Il est crédible d'imaginer que la présence des segments transmembranaires augmenterait la concentration locale des protéines et favoriserait le complexe hétérohexamérique (**Figure I.30**).

Le complexe FtsBLQ a longtemps été considéré comme une plateforme pour le recrutement de protéines en aval, notamment le complexe FtsW-PBP3 et FtsN (Gonzalez and Beckwith, 2009; Gonzalez *et al.*, 2010 ; Kureisaite-Ciziene *et al.*, 2018). Plus récemment un rôle de FtsBLQ dans la régulation de la synthèse du PG septal (sPG), en tant que probable intermédiaire entre FtsN et cette synthèse, a émergé (Liu *et al.*, 2015 ; Tsang & Bernhardt, 2015). En effet, différentes mutations ponctuelles dans les régions périplasmiques de FtsB (ex : E56, D59) et de FtsL (ex : D93) sont suffisantes pour permettre à la bactérie de se diviser et de survivre en absence de FtsN ou de la région essentielle de FtsN (E FtsN)(voir point 1.2.2.3.7). Les mutations suppressives dans FtsB et FtsL se situent dans les zones conservées et chargées négativement appelées

CCD (« constriction control subdomain ») (Liu *et al.*, 2015 ; Villanelo *et al.*, 2011). Par ailleurs, il semblerait que FtsA intervienne également dans la régulation de la synthèse du sPG en interagissant avec FtsN et possiblement avec FtsBLQ et/ou d'autres composants du divisome tel FtsW-PBP3 (Liu *et al.*, 2015 ; Di Lallo *et al.*, 2003 ; Corbin *et al.*, 2004 ; Karimova *et al.*, 2005). Une vue globale du modèle de la synthèse du sPG est détaillée au point **1.2.2.4**.

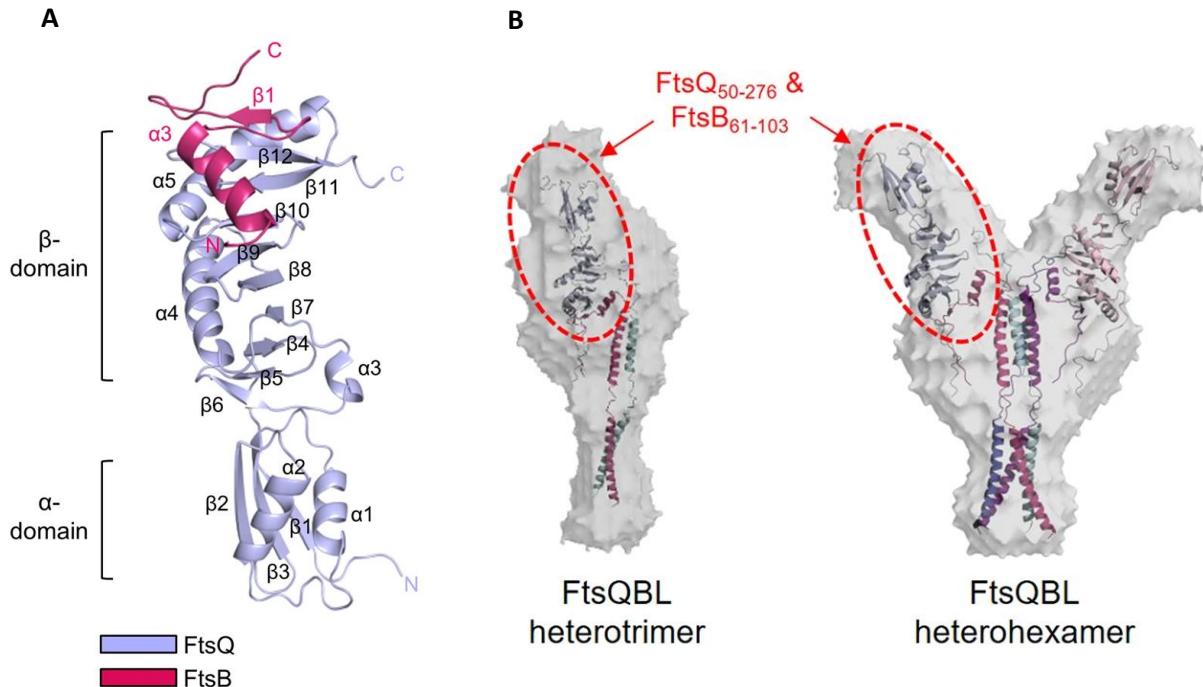


Figure I.30 : Structure de la protéine FtsQ d'*E. coli* et modèle du complexe FtsBLQ.

- A. Structure du complexe FtsQ (AA 50–276)/FtsB (AA 25–103) (Choi *et al.*, 2018).
- B. Modèles du complexe FtsBLQ sous forme d'hétérotrimère et d'hétérohexamère basés sur des expériences de SAXS (Choi *et al.*, 2018).

1.2.2.3.5 Le complexe FtsW-PBP3

Le complexe FtsW-PBP3 est un complexe hautement conservé et essentiel à la division de la bactérie. La dynamique du complexe suit *in vivo* la dynamique du mouvement de FtsZ (Fraipont *et al.*, 2011 ; Perez *et al.*, 2019 ; Reichmann *et al.*, 2019). La localisation de FtsW au divisome dépend de FtsB et FtsL (Goehring *et al.*, 2006). FtsW (46 kDa) appartient à la famille SEDS et est composé de dix hélices α transmembranaires, de cinq boucles périplasmiques, dont une large boucle entre l'hélice α 7 et 8, les 2 extrémités de la protéine se retrouvant dans le cytoplasme (**Figure I.31.A**) (Lara *et al.*, 2002 ; Pastoret *et al.*, 2004). FtsW est essentiel pour le recrutement de PBP3 (63 kDa) au site de division par l'intermédiaire de la boucle périplasmique 9/10 (Pastoret *et al.*, 2004). La boucle 7/8 est également essentielle à l'interaction avec PBP3 et à la fonction de la protéine (Pastoret *et al.*, 2004 ; Leclercq *et al.*, 2017). En outre, la boucle 4/5 et le segment transmembranaire 8 sont deux déterminants pour la conformation de FtsW (Pastoret *et al.*, 2004). Par ailleurs, FtsW interagit avec le Lipide II et également d'autres PG synthases tels MtgA ou encore PBP1b avec laquelle il forme un complexe ternaire : FtsW-PBP3-PBP1b

(Derouaux *et al.*, 2008 ; Leclercq *et al.*, 2017). On a longtemps attribué à FtsW la fonction de flippase du Lipide II, sur base d'expérience *in vitro*, avec le rôle crucial des résidus R145 et K153 (Mohammadi *et al.*, 2011 ; Mohammadi *et al.*, 2014). En 2016, la protéine RodA, un autre membre de la famille SEDS associé à la machinerie d'elongation, a montré une activité GTase *in vivo* et *in vitro* (Meeske *et al.*, 2016 ; Cho *et al.*, 2016). La structure de RodA révèle d'ailleurs une cavité présentant des résidus essentiels pour l'activité de l'enzyme (Sjödt *et al.*, 2018). Plus récemment, une structure du complexe RodA/PBP2 révèle différentes conformations du complexe avec une grande dynamique de PBP2 via son module N-terminal, et explique comment PBP2 stimule l'activité GTase de RodA via ce domaine N-terminal à proximité du feuillet externe de la membrane cytoplasmique (Sjödt *et al.*, 2020). Concernant FtsW, des résultats suggèrent également chez différentes bactéries une activité GTase uniquement en présence de son bPBP partenaire (Taguchi *et al.*, 2019 ; Welsh *et al.*, 2019). Néanmoins, aucune activité *in vitro* de FtsW-PBP3 n'a pu être mise en évidence chez *E. coli* jusqu'à présent. Une étude a démontré l'importance cruciale d'un aspartate pour l'activité GTase de FtsW (D275 pour *P. aeruginosa*, correspondant au D297 pour *E. coli*). Dans cette même étude, il a été montré que l'activité TPase du bPBP partenaire n'est pas nécessaire pour la stimulation de l'activité GTase de FtsW par le bPBP (Taguchi *et al.*, 2019). En outre, au-delà de l'activité GTase des protéines SEDS, des résultats révèlent l'importance de ces protéines dans la localisation de MurJ et suggèrent une collaboration de MurJ avec les protéines SEDS pour le transport du Lipide II (Liu *et al.*, 2018).

La protéine PBP3 est un bPBP essentiel, présentant, en plus du domaine TPase, un domaine N-terminal non enzymatique (**Figure I.31.B**). La mutation de la sérine active du domaine TPase mais également différentes mutations dans le module N-terminal de PBP3 (ex : R210Q/R213Q, R166Q/R167Q) génèrent un phénotype de filamentation montrant l'importance de ce dernier dans le processus de division (Marrec-Fairley *et al.*, 2000). La localisation de PBP3 au site de division nécessite au moins la région transmembranaire suivie de 17 premiers acides aminés de la portion périplasmique et dépend évidemment de FtsW (Mercer & Weiss, 2002 ; Piette *et al.*, 2004 ; Wissel & Weiss, 2004). En plus de l'interaction avec FtsW, PBP3 serait capable de dimériser ainsi que d'interagir avec plusieurs protéines du divisome dont FtsN, FtsA, FtsK, FtsQ, FtsL ou encore la transglycosylase lytique Slt70, bien que les détails sur les sites exacts d'interaction n'ont pas été élucidés (Müller *et al.*, 2007 ; Di Lallo *et al.*, 2003 ; Karimova *et al.*, 2005 ; Romeis & Höltje, 1994 ; Fraipont *et al.*, 2011). Il existe une interaction entre PBP1b et PBP3, indirecte ou assez labile, impliquant notamment la portion N-terminale de PBP3 jusqu'au résidu 56 comprenant le segment cytoplasmique, la portion transmembranaire et une courte partie périplasmique (Bertsche *et al.*, 2006 ; Leclercq *et al.*, 2017). Cette interaction se manifeste cependant clairement dans le cadre du complexe ternaire FtsW-PBP3-PBP1b, comme précédemment mentionné (Leclercq *et al.*, 2017).

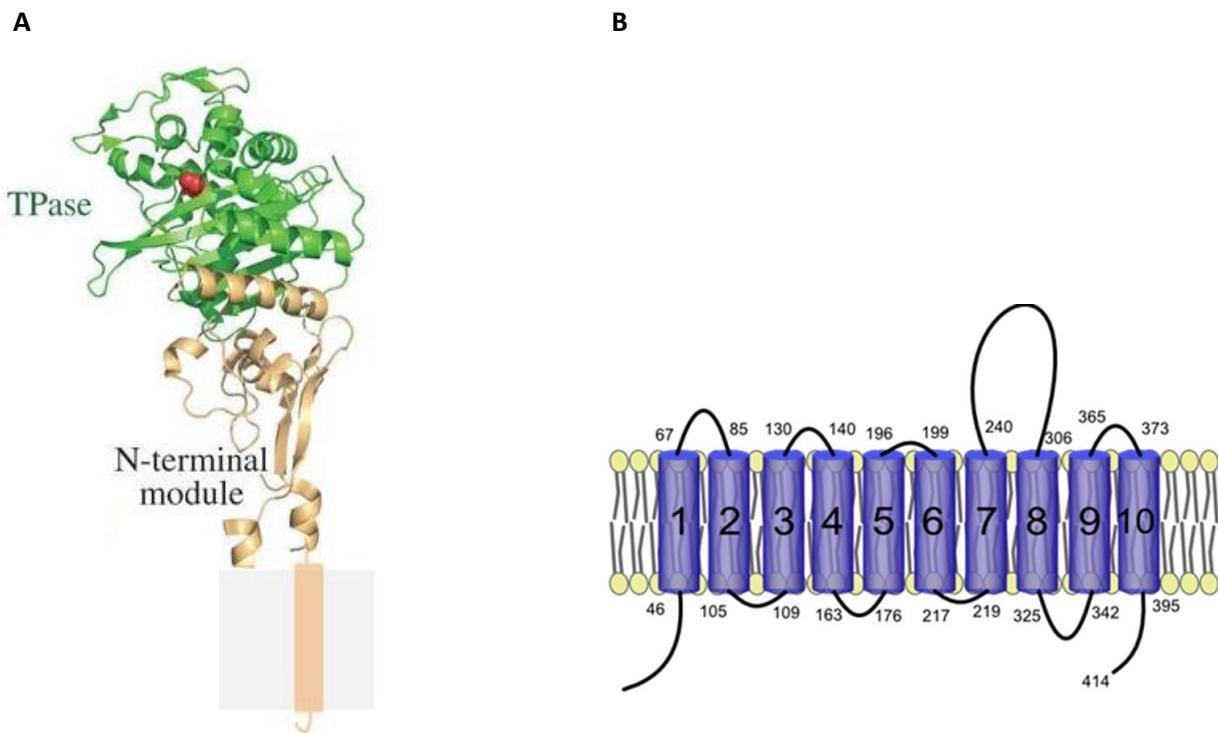


Figure I.31 : Structure de PBP3 et topologie de FtsW d'*E. coli*.

- A. Structure cristallographique de la portion soluble du PBP3 d'*E. coli* : le domaine TPase est représenté en vert avec la sérine active en rouge et le domaine N-terminal en brun clair (Egan *et al.*, 2015).
- B. Topologie de la protéine FtsW d'*E. coli* (Lara & Ayala, 2002). Les segments transmembranaires ancrés dans la membrane cytoplasmique sont représentés schématiquement et numérotés de 1 à 10. Les autres numéros indiquent les débuts et fins de ces segments (numéros des acides aminés).

1.2.2.3.6 Le PBP1b et ses régulateurs

PBP1b (94 kDa) est un aPBP possédant la double activité GTase et TPase (Terrak *et al.*, 1999). Comme précédemment mentionné, PBP1b ou PBP1a sont nécessaires pour la survie de la bactérie, ce qui indique une certaine redondance de ces deux protéines bien que le PBP1b soit prédominant au site de division alors que le PBP1a est principalement impliqué dans l'elongation du sacculus (Typas *et al.*, 2011). PBP1b est composé : d'une courte portion cytoplasmique, d'une hélice α transmembranaire (AA 64-87), d'un domaine UB2H (AA 109-200) impliqué dans l'interaction avec différents partenaires, un domaine GTase associé à la membrane cytoplasmique (AA 203-367), une région « linker » entre le domaine GTase et TPase (AA 391-443) et enfin le domaine TPase C-terminal (AA 444-736) suivi d'une extension C-terminale (AA 737-844) (**Figure I.32.A**) (Typas *et al.*, 2010 ; Paradis-Bleau *et al.*, 2010 ; Egan *et al.*, 2014 ; King *et al.*, 2014 ; Sung *et al.*, 2009 ; King *et al.*, 2017). Il est important de mentionner que la portion cytoplasmique varie en taille car deux sites d'initiations (M1 et M46) donnent respectivement les formes α et γ du PBP1b (Kato *et al.*, 1984). La forme β du PBP1b résulte de la protéolyse du α -PBP1b après le résidu R25 (Henderson *et al.*, 1994). Le PBP1b interagit avec de nombreuses protéines dont des constituants du divisome (**Figure I.32.B**) (Müller *et al.*, 2007 ; Bertsche *et al.*, 2007 ; Gray *et al.*, 2015 ; Leclercq *et al.*, 2017). PBP1b interagit, assez faiblement, avec PBP3, mais interagit plus fortement avec FtsW prenant part au complexe ternaire FtsW-PBP1b-PBP3 (Bertsche *et al.*, 2006 ; Leclercq *et al.*, 2017). Par ailleurs, de nombreuses méthodes ont démontré l'interaction de PBP1b avec FtsN et la stimulation des activités

GTase et TPase du PBP1b par FtsN (Müller *et al.*, 2007). Cette stimulation dépend fortement de la présence du segment transmembranaire de FtsN (voir point 1.2.2.3.7) (Müller *et al.*, 2007 ; Pazos *et al.*, 2018).

Le PBP1b est également en interaction avec la lipoprotéine LpoB ancrée dans la membrane externe, cette dernière interagit avec le domaine UB2H et stimule les activités GTase et TPase du PBP1b (Demchick & Koch, 1996 ; Vazquez-Laslop *et al.*, 2001 ; Matias *et al.*, 2003 ; Paradis-Bleau *et al.*, 2010 ; Typas *et al.*, 2010 & 2012 ; Lupoli *et al.*, 2014 ; Egan *et al.*, 2014 ; Jean *et al.*, 2014) (**Figure I.32.C**). La protéine LpoB est composée d'une région N-terminale allongée et désordonnée (~ 145 Å) permettant au domaine globulaire C-terminal de traverser le périplasme et d'atteindre le domaine UB2H du PBP1b (King *et al.*, 2014 ; Egan *et al.*, 2014). L'interaction directe entre le domaine globulaire C-terminal de LpoB et le domaine UB2H de PBP1b induit des changements conformationnels aux extrémités de ce domaine (Egan *et al.*, 2014 ; Markovski *et al.*, 2016 ; Greene *et al.*, 2018 ; Egan *et al.*, 2018). Ces changements se répercuteraient, via un réseau de liaisons hydrogène, dans les deux domaines catalytiques du PBP1b, expliquant la stimulation des activités GTase et TPase du PBP1b (Greene *et al.*, 2018 ; Egan *et al.*, 2018).

Une couche supplémentaire de régulation du PBP1b par la protéine CpoB, interagissant avec le système Tol-Pal permet d'inhiber sélectivement la stimulation médiée par LpoB et ainsi de coordonner la synthèse du PG et la constriction de la membrane externe (Gray *et al.*, 2015). En détail, CpoB se localise au site de division pratiquement en même temps que le PBP1b, LpoB et FtsN, bien qu'indépendamment de PBP1b (Gray *et al.*, 2015). Au site de division, CpoB interagit spécifiquement avec PBP1b en liant une région entre le domaine TPase et le domaine UB2H (**Figure I.32.D**) (Gray *et al.*, 2015). CpoB interagit également avec TolA, mais LpoB n'interagit ni avec CpoB ni avec TolA (Gray *et al.*, 2015). L'existence des complexes ternaires LpoB-PBP1b-CpoB et LpoB-PBP1b-TolA a été démontré et suggère l'existence d'un complexe quaternaire entre PBP1b, LpoB, CpoB, et TolA (Gray *et al.*, 2015). Dans ce contexte, l'étude des régulations des activités du PBP1b suggère un modèle : une fois le système TolQR – TolA activé (voir point 1.2.2.3.10), TolA empêche CpoB d'interagir avec LpoB et dès lors d'inhiber la stimulation de l'activité TPase du par LpoB (Gray *et al.*, 2015 ; Egan *et al.*, 2018). Dans l'état non activé, TolA exerce un effet indirect sur l'activité TPase et n'empêche plus CpoB d'interagir avec le complexe PBP1b-LpoB : LpoB peut stimuler l'activité TPase du PBP1b. Par ailleurs, dans cette même configuration, TolA a un effet direct sur la stimulation de l'activité GTase du PBP1b, additive à la stimulation de cette même activité par LpoB (Gray *et al.*, 2015 ; Egan *et al.*, 2018). Il y a donc une régulation dynamique de l'activité du PBP1b en réponse à l'état du système Tol-Pal (Gray *et al.*, 2015).

Malgré de nombreuses connexions entre le PBP1b et l'appareil de division comme précédemment explicité, PBP1b semble fonctionner spatialement en dehors de la machinerie guidée par FtsZ (Cho *et al.*, 2016). Cette observation n'exclut pas des contacts entre le PBP1b et certains éléments de l'édifice du divisome puisque FtsN non plus ne semble pas suivre la dynamique de constriction de l'anneau FtsZ (Söderström *et al.*, 2018 2019, Cho *et al.*, 2016 ; Leclercq *et al.*, 2017). Le fait que l'inhibition d'un des systèmes conduit à la lyse de la bactérie montre, qu'il y a très probablement une complémentarité entre le système SEDS/bPBP (FtsW/PBP3) et celui du PBP1b pour la synthèse d'un PG fonctionnel (Cho *et al.*, 2016 ; Vigouroux *et al.*, 2020).

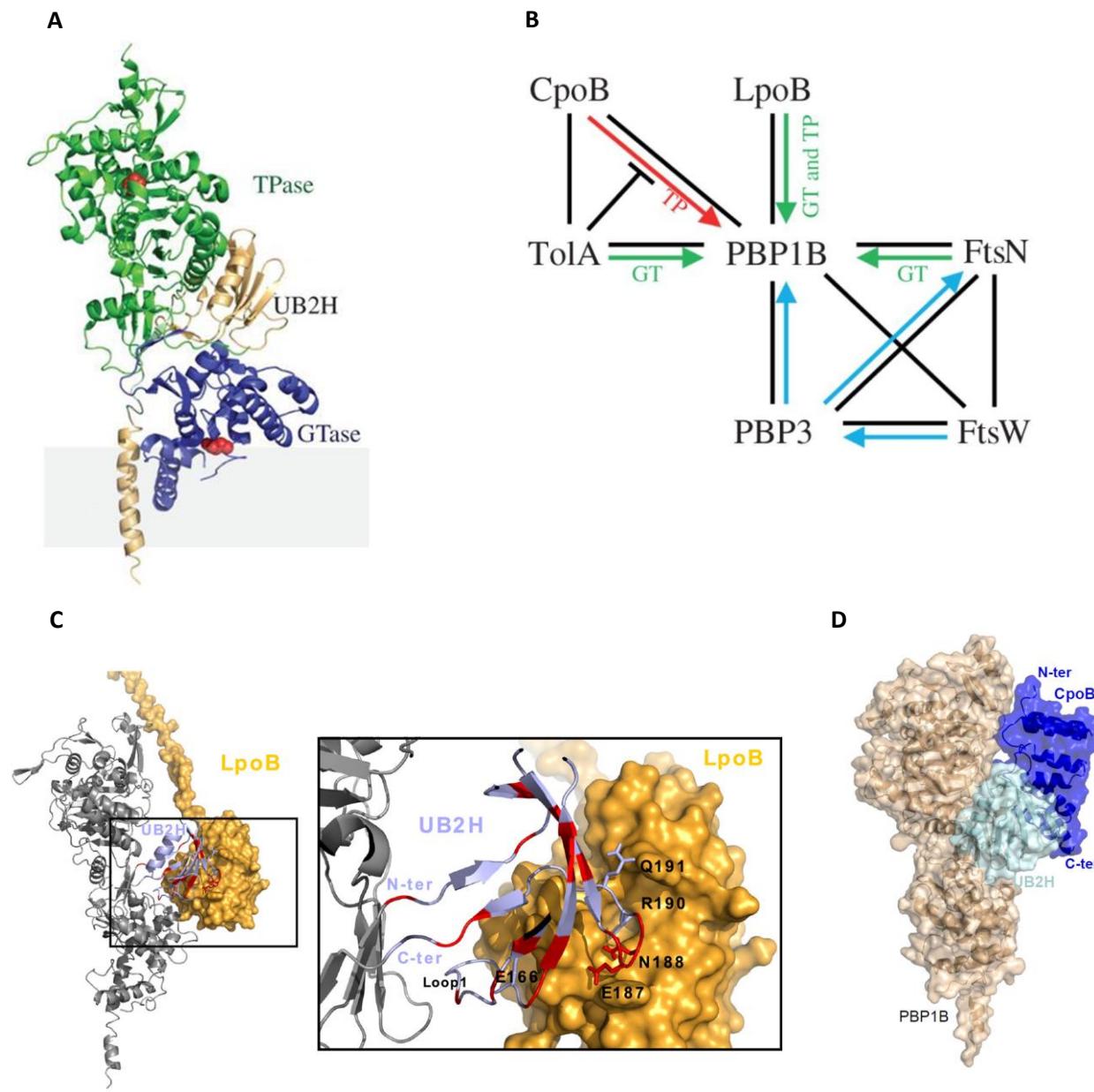


Figure I.32 : Structure du PBP1b d'*E. coli* et interactions avec ces protéines partenaires.

- Structure cristallographique du PBP1b d'*E. coli*. Les zones rouges sont les résidus actifs des deux domaines catalytiques (E290 du domaine GTase et S510 du domaine TPase) (Egan *et al.*, 2015).
- Réseau d'interactions incluant le PBP1b : les flèches bleues indiquent le recrutement *in vivo*, les lignes noires indiquent les interactions directes. Les stimulations des activités GTase et/ou TPase sont indiquées avec des flèches vertes alors que la flèche rouge indique la modulation négative par CpoB sur le couple PBP1b-LpoB, TolA s'opposant à cet effet (ligne noire en « T ») (Egan *et al.*, 2015).
- Modèle du complexe PBP1b-LpoB : la boucle 186 à 191 de LpoB est cruciale pour l'interaction. Les régions en rouge subissent d'importantes perturbations suite à l'interaction de LpoB avec le domaine UB2H du PBP1b (Egan *et al.*, 2018).
- Modèle du complexe PBP1b, avec la région C-terminale de CpoB (en bleu), basé sur des données de « crosslinking » (Egan *et al.*, 2018).

1.2.2.3.7 FtsN

FtsN (36 kDa) est une protéine bitopique présentant une courte portion cytoplasmique (AA 1-33), un segment transmembranaire (AA 34-53) et une large portion périplasmique constituée de différentes parties : une région à proximité de la membrane comportant trois courtes hélices α (AA 62-67, 80-93, 117-123), une région non structurée d'environ 120 acides aminés riche en glutamine, et un domaine SPOR « Sporulation-related repeat » C-terminal présentant une structure $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ qui se lie au sPG (**Figure I.33**) (Nagai *et al.*, 1990 ; Addinall *et al.*, 1997 ; Dai *et al.*, 1996 ; Ursinus *et al.*, 2004 ; Yang *et al.*, 2004). La liaison du domaine SPOR au sPG implique principalement les brins $\beta 1$ et 2 et surtout la chaîne principale plutôt que les chaînes latérales (Alcorlo *et al.*, 2019). Cependant, bien que le domaine SPOR contribue clairement à la fonction de FtsN, il n'est pas essentiel, car les mutants dépourvus du domaine SPOR restent viables (Ursinus *et al.*, 2004 ; Gerding *et al.*, 2009 ; Busiek et Margolin, 2014). Paradoxalement, deux cystéines (Cys252 et Cys312), formant un pont disulfure dans ce domaine SPOR, sont essentielles pour la stabilité, la localisation et la fonctionnalité de la protéine engendrant une filamentation du double mutant, bien que la structure globale de la protéine ne semble pas être affectée par l'absence de ce pont disulfure (Duncan *et al.*, 2013 ; Meehan *et al.*, 2017). Il est à noter que l'interface de liaison SPOR:PG est partiellement occluse par la boucle reliant l'hélice $\alpha 2$ au brin $\beta 4$ et que les deux cystéines de cette région pourraient, en formant un pont disulfure, réorganiser la région, expliquant la corrélation expérimentale entre la liaison au PG et la formation de ce pont disulfure dans le domaine SPOR de FtsN (Meehan *et al.*, 2017 ; Alcorlo *et al.*, 2019).

FtsN est la dernière protéine essentielle à se localiser au site de division (Addinall *et al.*, 1997 ; Ursinus *et al.*, 2004). Cette localisation est dépendante de FtsZ, FtsA, FtsI, FtsQ et nécessite la portion périplasmique de FtsN, en plus du domaine SPOR qui constitue le déterminant principal de la localisation et l'accumulation septale de FtsN via une boucle de rétroaction positive détaillée au point **1.2.2.4** (Dai *et al.*, 1996 ; Addinall *et al.*, 1997 ; Gerding *et al.*, 2009 ; Moll & Thanbichler, 2009). Néanmoins, FtsA recrute une faible quantité de FtsN indépendamment de l'interaction SPOR:PG et implique l'interaction directe de la portion cytoplasmique de FtsN avec le domaine IC de FtsA (van den Ent and Löwe, 2000 ; Busiek and Margolin, 2014 ; Corbin *et al.*, 2004 ; Busiek *et al.*, 2012 ; Rico *et al.*, 2004). L'arrivée de FtsN coïncide avec la constriction cellulaire suggérant que FtsN déclenche la synthèse du sPG agissant probablement sur un ou des acteurs de la synthèse du sPG (Corbin *et al.*, 2004 ; Gerding *et al.*, 2009 ; Lutkenhaus, 2009 ; Liu *et al.*, 2015 ; Tsang & Bernhardt, 2015). De plus, un rôle de FtsN dans le recrutement et l'activation des amidases a d'ailleurs été suggéré bien qu'aucune interaction directe n'a été démontrée (Wissel & Weiss, 2004 ; Karimova *et al.*, 2005 ; Müller *et al.*, 2007 ; Gerding *et al.*, 2009 ; Arends *et al.*, 2010). Par ailleurs, d'autres fonctions sont attribuées à FtsN incluant la stabilisation des complexes protéiques associés à la paroi cellulaire ou encore l'établissement d'un lien entre la membrane interne et la couche de PG (Chen and Beckwith, 2001 ; Rico *et al.*, 2010 ; Yahashiri *et al.*, 2017).

La fonction principale de FtsN dans la constriction cellulaire a été délimitée à une petite portion centrée autour de la courte hélice $\alpha 2$ (AA 75-93) appelée domaine essentiel de FtsN ou F FtsN (Gerding *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2015). En particulier, trois résidus de cette région (W83, Y85 et L89) sont cruciaux pour la fonction de FtsN, et sont probablement impliqués dans l'interaction de manière directe ou indirecte avec la cible de FtsN (Gerding *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2015, Weiss, 2015). FtsN interagit avec PBP1b, PBP3 et la MtgA qui pourraient tous potentiellement être la cible de FtsN mais PBP3, protéine réellement essentielle à la division, a été proposé comme le candidat privilégié de cette régulation (Wissel and Weiss, 2004 ; Karimova *et al.*, 2005 ; Müller *et al.*, 2007 ; Derouaux *et al.*, 2008 ; Alexeeva *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2015 ; Tsang & Bernhardt, 2015).

Des données en microscopie à haute résolution ont montré que pendant la phase de constriction cellulaire, les protéines précoces (FtsZ, FtsA, ZipA) étaient largement séparées des protéines nécessaires à la synthèse PG, dont FtsN ou encore FtsQ, PBP3 et FtsL (Söderström *et al.*, 2016 ; Söderström & Daley, 2017). En particulier, on observe une augmentation de la distance radiale entre FtsZ et FtsN pendant la constriction : avant le début de la constriction, les rayons des deux « anneaux » se chevauchent, à mesure que la constriction de l'enveloppe cellulaire progresse, la différence radiale entre FtsZ et FtsN augmente (Söderström *et al.*, 2018 & 2019). Il a d'ailleurs été démontré que, *in vitro*, FtsN se lie directement au cofilament FtsZ – FtsA pour former un complexe, mais seulement de manière transitoire (Baranova *et al.*, 2020).

Récemment, un effet du pH sur la taille cellulaire a été relié à l'affinité pH dépendante de FtsN pour le divisome impactant le volume auquel les cellules initient la division (Mueller *et al.*, 2020). En effet, une acidification du milieu augmenterait l'affinité de FtsN pour la machinerie de division déclenchant une division plus précoce (Mueller *et al.*, 2020). Le mécanisme exact soutenant ce phénomène est mal compris, mais implique les zones d'interaction de FtsN avec FtsA ainsi que la région essentielle de FtsN (Mueller *et al.*, 2020). Au contraire, le domaine SPOR n'est pas requis excluant l'interaction SPOR:PG dans ce mécanisme de contrôle de la taille cellulaire pH dépendant (Mueller *et al.*, 2020). Malgré toutes ces observations, les mécanismes moléculaires exacts de fonctionnement de FtsN, et en particulier sa cible, restent mal compris.

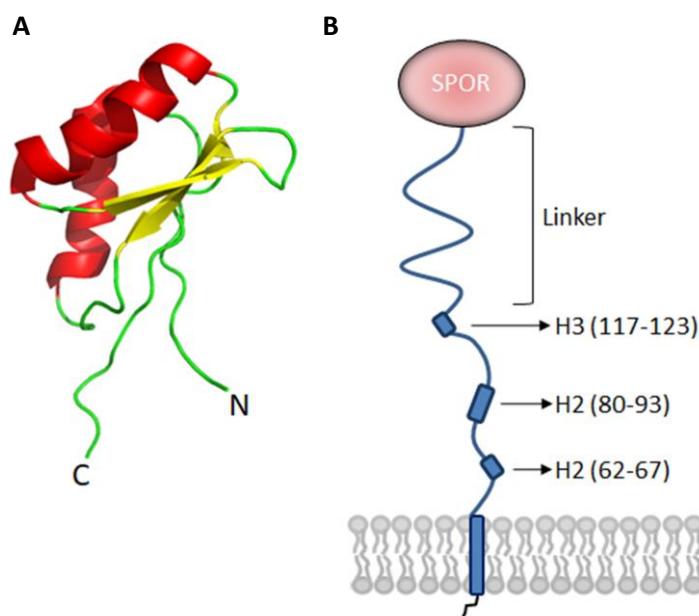


Figure I.33 : Topologie du FtsN et structure du domaine SPOR C-terminal chez *E. coli*.

- A. Structure du domaine SPOR de la protéine FtsN d'*E. coli* (Yang *et al.*, 2004).
- B. Topologie de la protéine FtsN : la région N-terminale cytoplasmique fait place à une hélice α C-terminale. La région cytoplasmique contient trois courtes hélices α prédictives (H1, H2 et H3) suivies d'un « linker » riche en glutamine puis du domaine SPOR liant le PG septal. Les numéros entre parenthèse indiquent les positions des acides aminés (Yang *et al.*, 2004).

1.2.2.3.8 DamX, DedD et RlpA : autres protéines à domaine SPOR

Le domaine SPOR est très répandu dans le monde bactérien, en plus de FtsN, on retrouve chez *E. coli* trois autres protéines possédant un domaine SPOR : DamX, DedD et RlpA se localisant toutes au site de division principalement via ce domaine (Finn *et al.*, 2014 ; Gerding *et al.*, 2009 ; Arends *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2019). DedD et DamX ont une topologie proche de FtsN alors que RlpA est une lipoprotéine (**Figure I.34**) (Arends *et al.*, 2010). Cependant, contrairement à FtsN, les trois autres protéines sont individuellement non essentielles (Baba *et al.*, 2006 ; Arends *et al.*, 2010). La délétion de DamX ou RlpA ne

cause pas de phénotype particulier alors que la délétion de DedD provoque une faible filamentation. Par contre, la double délétion DedD/DamX se répercute par un phénotype plus sévère de filamentation (Gerding *et al.*, 2009 ; Arends *et al.*, 2010). Le fait que la perte de DamX exacerbé le défaut de division des mutants DedD implique que DamX contribue également positivement à la division cellulaire. Cependant, la surexpression de DamX engendre de la filamentation (Lyngstadaas *et al.*, 1995). La protéine RlpA est peut-être la plus énigmatique des protéines à domaine SPOR d'*E. coli* car la délétion du gène *r/pA* n'engendre pas de phénotype évident et même la combinaison de sa délétion avec celle de DamX ou de DedD n'a pas d'effet additif sur le phénotype (Arends *et al.*, 2010). Le rôle présumé pour RlpA serait de relier la membrane externe au PG pendant la constriction (Arends *et al.*, 2010). Aucune des protéines SPOR n'a d'activité enzymatique démontrée cependant un homologue de RlpA chez *P. aeruginosa* possède une activité de transglycosylase lytique agissant sur des chaînes de glycanes dépourvues de peptide (Jorgenson *et al.*, 2014).

DamX serait recruté au divisome de manière assez précoce puis interagirait fortement avec elle-même, FtsQ et FtsN et faiblement avec FtsZ, FtsA, PBP3 et FtsL (Arends *et al.*, 2010). En outre, de fortes interactions ont été mises en évidence par des expériences de double hybride (BATCH) entre DedD et le domaine N-terminal de FtsK ainsi que FtsQ. De plus faibles interactions impliquant DedD ont été détectées avec : FtsA, FtsL, ZipA, PBP3, FtsB, PBP1A, PBP1B, TolA, FtsN et DedD lui-même (Liu *et al.*, 2019). Chez *E. coli*, DedD devient essentiel lorsque FtsN est remplacé par une forme tronquée s'arrêtant au résidu 117, soit juste avant la courte hélice α 3 (Gerding *et al.*, 2009). Récemment, il a été démontré que la région transmembranaire ainsi que les premiers résidus périplasmiques (AA 1-54 et en particulier la région 36-54) sont importants et suffisants pour sa fonction (Liu *et al.*, 2019). Le domaine SPOR de DedD est important, bien que non essentiel, pour la localisation de la protéine au site de division mais contribue à l'efficacité de la région essentielle de DedD (Gerding *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2019). Par ailleurs, les résidus G11 et P24, situés dans le segment transmembranaire, jouent un rôle important dans le recrutement SPOR-indépendant et dans la fonction de la protéine (Liu *et al.*, 2019). Un modèle suggère que DedD agirait en parallèle avec FtsN pour stimuler l'activité de FtsW-PBP3 possiblement via une interaction avec le complexe FtsBLQ (Liu *et al.*, 2019). Bien que DamX, DedD et RlpA sont impliqués dans la division, le rôle exact de ces protéines au sein du divisome reste inconnu (Gerding *et al.*, 2009, Arends *et al.*, 2010, Yahashiri 2017).

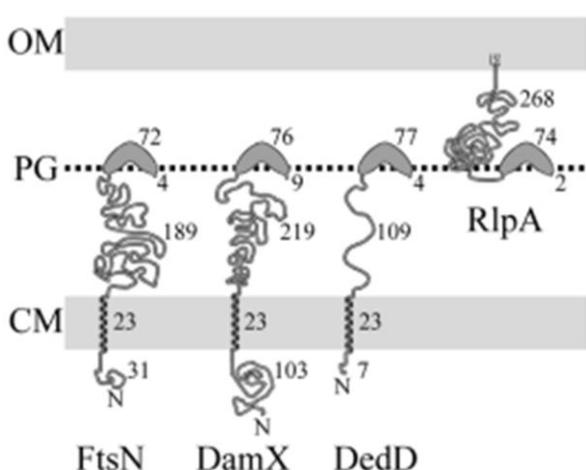


Figure I.34 : Protéines à domaines SPOR chez *E. coli*.

Topologie des protéines à domaine SPOR chez *E. coli*. Les numéros indiquent le nombre d'acides aminés des différentes régions (CM : membrane cytoplasmique ; OM : membrane externe ; PG : peptidoglycane) (Arends *et al.*, 2010).

1.2.2.3.9 Les amidases (AmiA, B et C) et leurs régulateurs (NlpD, EnvC)

Afin de permettre la séparation des deux cellules filles et de façonner les deux nouveaux pôles, le sPG nouvellement synthétisé doit être séparé grâce à l'activité des amidases périplasmiques clivant le lien entre le MurNAc et le peptide : AmiA (28 kDa), AmiB (45 kDa) et AmiC (45 kDa) (Heidrich *et al.*, 2001 ; Priyadarshini *et al.*, 2007 ; Uehara *et al.*, 2009). La délétion de ces trois amidases n'est pas létale, mais induit une filamentation avec une constriction de la membrane visible et un sPG non séparé (Heidrich *et al.*, 2001 ; Priyadarshini *et al.*, 2007). La délétion de *amiB* n'induit pas de problème de division alors que la délétion de *amiA* et *amiC* induit une filamentation modérée (Heidrich *et al.*, 2001). Ces enzymes sont des métallo-enzymes à Zn²⁺ qui doivent être activés par des régulateurs à domaine LytM (Uehara *et al.*, 2009). Ces derniers sont structurellement proches des métallo endopeptidases dont le membre fondateur est la lysostaphine clivant le pont pentaglycine du PG des staphylocoques, mais ne présentent pas une telle activité, car dépourvus des résidus essentiels à la liaison de l'ion Zn⁺⁺ (**Figure I.35**) (Firczuk and Bochtler, 2007 ; Uehara *et al.*, 2009 & 2010 ; Peters *et al.*, 2013). Le régulateur d'AmiA et AmiB est EnvC (42 kDa), une protéine soluble, alors que NlpD (37 kDa) est la lipoprotéine activatrice d'AmiC (Uehara *et al.*, 2010 ; Heidrich *et al.*, 2001 ; Rocaboy *et al.*, 2013 ; Uehara *et al.*, 2009 ; Peters *et al.*, 2013). Par ailleurs, NlpD possède un domaine de liaison au PG septal, le domaine LysM nécessaire et suffisant pour sa localisation (**Figure I.35**) (Tsang *et al.*, 2017). NlpD semble intervenir, en outre, dans le couplage entre l'invagination de la membrane externe et l'activité hydrolytique au site de division. En effet lorsque le système Tol-Pal est activé, la proximité de la membrane externe par rapport au PG permettrait à NlpD de jouer son rôle d'activateur d'AmiC, en collaboration avec une autre protéine de la membrane externe appelée YraP, mais les détails moléculaires restent inconnus (Tsang *et al.*, 2017). La double délétion de EnvC et NlpD induit un phénotype similaire à celui induit par la triple délétion AmiABC (Peters *et al.*, 2011 ; Pichoff *et al.*, 2019). Par ailleurs, AmiA et AmiC utilisent la machinerie TAT pour leur export dans le périplasme alors qu'AmiB utilise la machinerie SEC (Bernhardt & de Boer, 2003 ; Ize *et al.*, 2003). AmiB et AmiC se localisent spécifiquement au site de division, contrairement à AmiA, qui montre une localisation plus diffuse dans les cellules en cours de division (Bernhardt & de Boer, 2003 ; Peters *et al.*, 2011). La localisation d'AmiB, comme celle d'AmiC, est principalement dictée par le domaine N-terminal (AmiN) de ces protéines et ne nécessite pas le domaine C-terminal porteur de l'activité catalytique (Peters *et al.*, 2011) (Bernhardt & de Boer, 2003). Le domaine AmiN d'AmiC seul est capable de se lier au PG (**Figure I.35**) (Rocaboy *et al.*, 2013). D'autres déterminants sont essentiels à la localisation et la fonctionnalité des couples amidase/activateur. En effet, la synthèse sPG est requise pour la localisation des amidases mais pas pour le recrutement des facteurs NlpD et EnvC qui se localise plus précocement (Peters *et al.*, 2011). La localisation d'AmiB est FtsN-dépendante, en particulier ^EFtsN-dépendante, alors qu'EnvC s'accumule au site de division de manière FtsN-indépendante : AmiB et EnvC sont recrutés au divisome de manière indépendante (Peters *et al.*, 2011). Concernant AmiC et NlpD, ils se localisent également au site de division indépendamment l'un de l'autre, NlpD arrivant avant son amidase apparentée (Peters *et al.*, 2011). Tout comme AmiB, la localisation d'AmiC est ^EFtsN-dépendante, cependant, contrairement à EnvC, la localisation de NlpD est également ^EFtsN-dépendante (Peters *et al.*, 2011). Ces observations suggèrent un modèle où FtsN active la synthèse du sPG nécessaire pour le recrutement des activateurs, via leur domaine LytM, l'activation de AmiB et AmiC générant des chaînes de glycanes dénudées, substrat préférentiel du domaine SPOR de FtsN qui va s'accumuler davantage (Peters *et al.*, 2011 ; Gerding *et al.*, 2009 ; Rocaboy *et al.*, 2013).

Au niveau moléculaire, le mécanisme d'activation des amidases est le suivant : l'activité des amidases est bloquée avant la division cellulaire par une hélice α auto-régulatrice (l'hélice α 5 du domaine catalytique pour AmiC) qui obstrue l'accès du substrat au site actif. Lors de l'interaction de l'amidase avec son activateur, l'hélice alpha est déplacée rendant l'enzyme active (Yang *et al.*, 2011 ; Rocaboy *et al.*, 2013).

Comme mentionné auparavant, un autre partenaire s'est avéré essentiel pour l'activité des amidases : le complexe FtsEX (Yang *et al.*, 2011 & 2012). En effet, il a été montré qu'EnvC serait régulé par FtsEX via une interaction avec la grande boucle périplasmique de FtsX et que l'absence de ce complexe, tout comme l'absence d'EnvC, rend la division des bactéries NlpD-dépendante (Yang *et al.*, 2011). Il a dès lors été proposé un modèle dans lequel l'hydrolyse de l'ATP par FtsE modulerait l'interaction EnvC avec les amidases AmiA et AmiB permettant leur activation (Sham *et al.*, 2011 & 2013 ; Yang *et al.*, 2011 & 2012 ; Mavrici *et al.*, 2014). Cependant, *in vitro*, FtsEX n'est pas nécessaire pour observer l'activation des amidases AmiAB par EnvC, rendant ce modèle au moins incomplet (Pichoff *et al.*, 2019). Une autre hypothèse suggère que FtsA, interagissant avec FtsN et FtsX, pourrait générer une boucle de rétroaction dans laquelle la liaison de FtsN à FtsA pourrait amener FtsX à promouvoir l'hydrolyse de l'ATP par FtsE, contrôlant ainsi l'activité des amidases (Pichoff *et al.*, 2019).

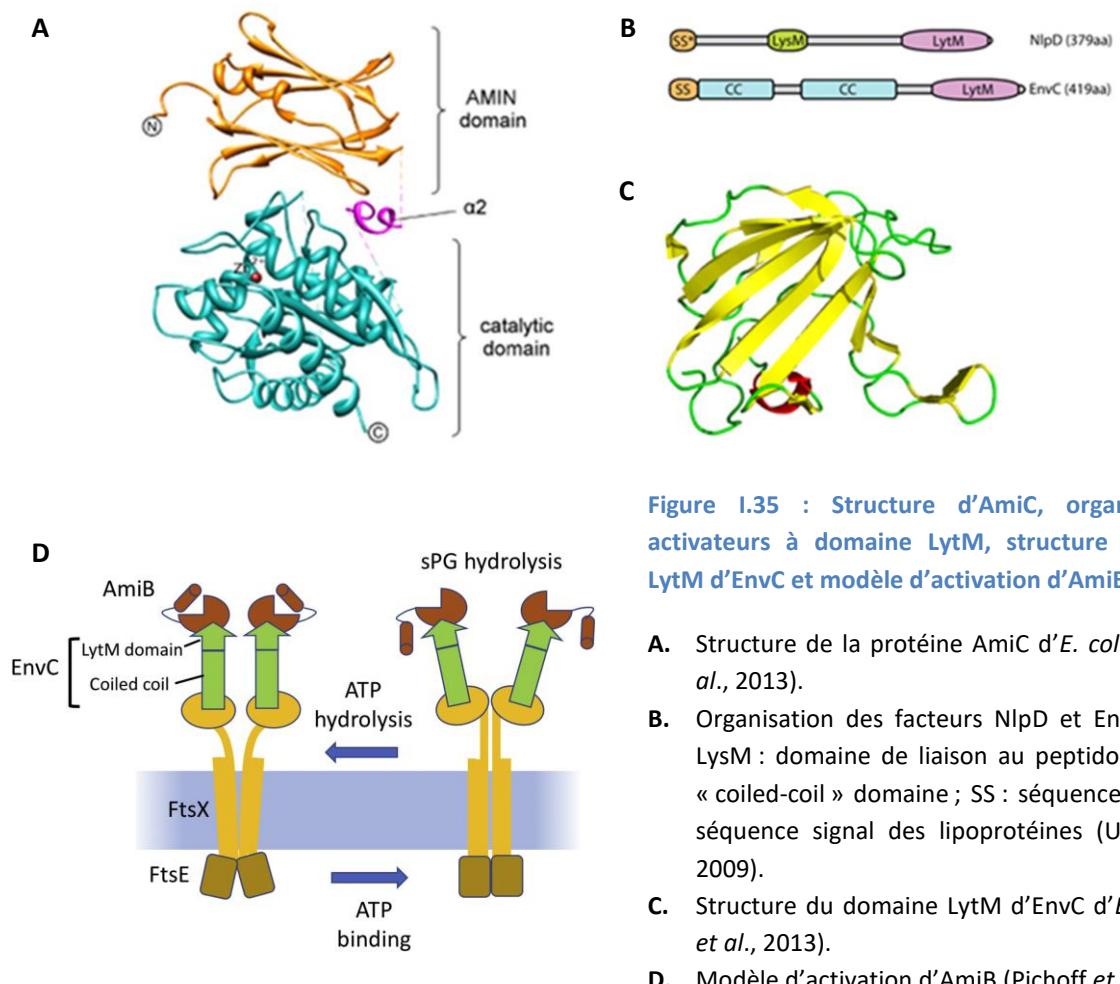


Figure I.35 : Structure d'AmiC, organisation des activateurs à domaine LytM, structure du domaine LytM d'EnvC et modèle d'activation d'AmiB.

- Structure de la protéine AmiC d'*E. coli* (Rocaboy *et al.*, 2013).
- Organisation des facteurs NlpD et EnvC d'*E. coli* ; LysM : domaine de liaison au peptidoglycane ; CC : « coiled-coil » domaine ; SS : séquence signal ; SS* : séquence signal des lipoprotéines (Uehara *et al.*, 2009).
- Structure du domaine LytM d'EnvC d'*E. coli* (Peters *et al.*, 2013).
- Modèle d'activation d'AmiB (Pichoff *et al.*, 2019).

1.2.2.3.10 Le système Tol-Pal : invagination de la membrane externe

La constriction de la membrane externe au moment de la division cellulaire est favorisée par le système Tol-Pal, qui s'accumule au cours des derniers stades de la division cellulaire au site de division (Gerding et al., 2007). Ce système implique les protéines de la membrane cytoplasmique TolQ, TolR et TolA, qui forment un complexe, la protéine périplasmique TolB et la lipoprotéine Pal de la membrane externe, toutes codées par deux opérons adjacents (**Figure I.36**) (Derouiche et al., 1995 ; Lazzaroni et al., 1995 ; Journet et al., 1999). Le système Tol-Pal n'est pas essentiel à la viabilité d'*E. coli*, contrairement à d'autres bactéries à Gram négatif, mais la perte de l'un de ces composants entraîne différents défauts, selon les conditions, tel un retard de la constriction de la membrane externe et donc de la filamentation ou encore une perte d'intégrité de la membrane externe avec une sensibilité accrue aux antibiotiques (Dennis et al., 1996 ; Bernstein et al., 1972 ; Meury & Devilliers, 1999 ; Cascales et al., 2002 ; Gerding et al., 2007 ; Yeh et al., 2010 ; Lo Sciuto et al., 2014 ; Yakhnina & Bernhardt, 2020). Le système exploite la force proton-motrice (PMF), lié au passage de proton du périplasme vers le cytoplasme via TolQR, un homologue du moteur flagellaire MotAB, favorisant la constriction de la membrane externe (Cascales et al., 2000 ; Cascales et al., 2001 ; Germon et al., 2001 ; Gerding et al., 2007)

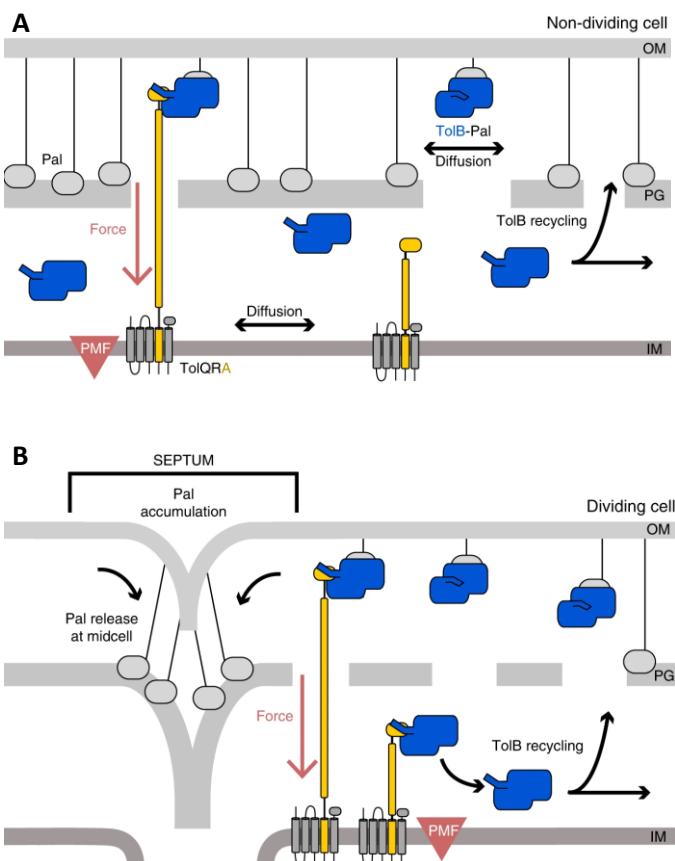
TolQ (25 kDa) est composé de trois hélices α transmembranaires interagissant avec TolR (15 kDa) et TolA (40 kDa) (Derouiche et al., 1995 ; Lazzaroni et al., 1995 ; Germon et al., 1998 ; Journet et al., 1999 ; Zhang et al., 2011). Le complexe TolQR est homologue au complexe ExbB/ExbD et se complémentise l'un l'autre (Braun & Herrmann, 1993). Dès lors TolQ-TolR devrait former une structure proche de son homologue : un complexe pentamérique en pore formé par TolQ, associé à un dimère de TolR se situant dans le pore et assurant sa régulation via des changements de conformation (Goemaere et al., 2007 ; Parsons et al., 2008 ; Zhang et al., 2009 ; Wojdyla et al., 2015 ; Celia et al., 2016 ; Celia et al., 2019 ; Deme et al., 2020). C'est la PMF couplée au mouvement de rotation de TolR par rapport à TolQ qui serait à l'origine de ces réorganisations (Deme et al., 2020).

TolA est une protéine de la membrane cytoplasmique comprenant trois domaines : une hélice α transmembranaire (TolAI), une région allongée riche en alanine et en résidus chargés traversant le périplasme (TolAII) et un domaine C-terminal globulaire (TolAIII) (Levengood et al., 1991 ; Witty et al., 2002 ; Rassam et al., 2018). Des résultats suggèrent que TolAI interagit avec TolQR pour former un complexe ternaire et que TolAIII interagit avec la protéine Pal (Germon et al., 1998 ; Cascales et al., 2000). L'interaction la plus importante est celle de TolAIII avec la partie N-terminale de TolB (Szczepaniak et al., 2020a ; Walburger et al., 2002 ; Bonsor et al., 2009). TolA, par son interaction transenveloppe avec TolB et son couplage avec le complexe TolQR, lui-même animé par la PMF permet la formation d'un complexe avec la protéine Pal : le complexe TolA-TolB-Pal (Germon et al., 2001 ; Szczepaniak et al., 2020a). Il y aurait donc des cycles d'extension-rétraction de TolA, en particulier de TolAII, liés aux flux de protons au travers du complexe TolQR (Szczepaniak et al., 2020a & 2020b).

TolB (45 kDa) est une protéine soluble périplasmique composée de deux domaines séparés par une courte région : un domaine α/β N-terminal liant la protéine TolA et un domaine β C-terminal interagissant avec Pal (Abergel et al., 1999 ; Bonsor et al., 2007 ; Bonsor et al., 2009 ; Szczepaniak et al., 2020a). La liaison TolB-Pal stabilise TolB diminuant l'interaction TolB-TolA (Bonsor et al., 2007 ; Bonsor et al., 2009). Des changements conformationnels dans les deux domaines de TolB se produisent l'interaction avec Pal se dissocie, favorisant l'interaction TolB-TolA (Bonsor et al., 2007 ; Bonsor et al., 2009).

La protéine Pal (16 kDa) est une lipoprotéine monomérique pouvant lier le PG ou TolB (Bouveret *et al.*, 1995 ; Clavel *et al.*, 1998 ; Abergel *et al.*, 2001 ; Parsons *et al.*, 2006). La protéine Pal lie le *mDAP* des peptides non pontés au sein du PG via un aspartate et une arginine conservée (Parsons *et al.*, 2006). Il est important de noter que les protéines Pal et TolB utilisent les mêmes résidus pour lier le PG (Bonsor *et al.*, 2007). Dès lors, TolB est crucial pour l'accumulation de Pal au site de division : TolB bloque la liaison de Pal au PG augmentant sa mobilité au sein de la membrane externe et permettant à la protéine Pal de prendre part au complexe Tol (Szczepaniak *et al.*, 2020a).

Le système Tol-Pal assure *in fine* : la coordination de l'activité de synthèse du PG avec l'invagination de la membrane externe via la protéine CpoB comme précédemment indiqué (voir point 1.2.2.3.6) et facilite la constriction de la membrane externe au site de division comme résumé et décrit sur la **Figure I.36** (Gerdung *et al.*, 2007 ; Gray *et al.*, 2015 ; Tsang *et al.*, 2017 ; Yakhnina & Bernhardt, 2020 ; Szczepaniak *et al.*, 2020a & 2020b).



1.2.2.4 Modèle général de constriction

Comme précédemment mentionné, la synthèse du sPG et son hydrolyse ciblée sont hautement régulées et aboutissent à la constriction cellulaire puis à la séparation des cellules filles grâce à l'action des amidases. Ces régulations impliquent au moins les protéines et complexes FtsBLQ, FtsN, FtsA, FtsEX (Liu *et al.*, 2015 ; Tsang & Bernhardt, 2015 ; Pichoff *et al.*, 2019). L'hypothèse émise quant à la collaboration de FtsBLQ, FtsN et FtsA pour la régulation de la synthèse du sPG repose principalement sur des données génétiques et est la suivante : la concentration en FtsN est au départ faible au sein du divisome, le complexe FtsBLQ est dans une conformation inactive bloquant la synthèse du sPG par FtsW-PBP3 et protéines associées. FtsA ancrant FtsZ à la membrane est également dans un état inactif. Les états inactifs de FtsBLQ et de FtsA se stabilisent mutuellement probablement par des interactions directes ou indirectes (Liu *et al.*, 2015 ; Tsang & Bernhardt, 2015). Ensuite, la concentration en FtsN augmente, et la région E FtsN stimule, directement ou indirectement, un changement conformationnel de FtsBLQ qui stimule alors la synthèse du sPG. La région cytoplasmique de FtsN quant à elle lie le domaine IC de FtsA et stimule une conformation active monomérique de FtsA stabilisant la conformation active de FtsBLQ et inversement, par interaction directe ou indirecte : la synthèse du sPG est activé (**Figure I.37**) (Busiek *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2015, Tsang & Bernhardt, 2015). Le processus d'accumulation de FtsN, élément clé du déclenchement de la synthèse du sPG est dicté par un modèle rétroaction positive : la petite quantité de FtsN, initialement recrutée par FtsA, stimule ainsi faiblement la synthèse du sPG. Ce dernier est clivé par les amidases permettant de recruter plus de FtsN, via son domaine SPOR, et de stimuler davantage la synthèse du sPG puis sa partition pour former les deux nouveaux pôles cellulaires (Gerdink *et al.*, 2009 ; Uehara *et al.*, 2010 ; Alcorlo *et al.*, 2019). Enfin, FtsEX, en plus de son implication dans la régulation positive des amidases, aurait un rôle dans la synthèse du sPG (Du *et al.*, 2016). En effet, FtsEX favorise la forme monomérique de FtsA menant au recrutement notamment de FtsN. FtsEX active ensuite les amidase de manière ATP dépendante, puis FtsEX lié à l'ADP bloque FtsA dans une forme inactive : la synthèse est bloquée. Des cycles répétés d'hydrolyse de l'ATP provoquent des cycles de synthèse et d'hydrolyse du sPG (Du *et al.*, 2016 , Pichoff *et al.*, 2019).

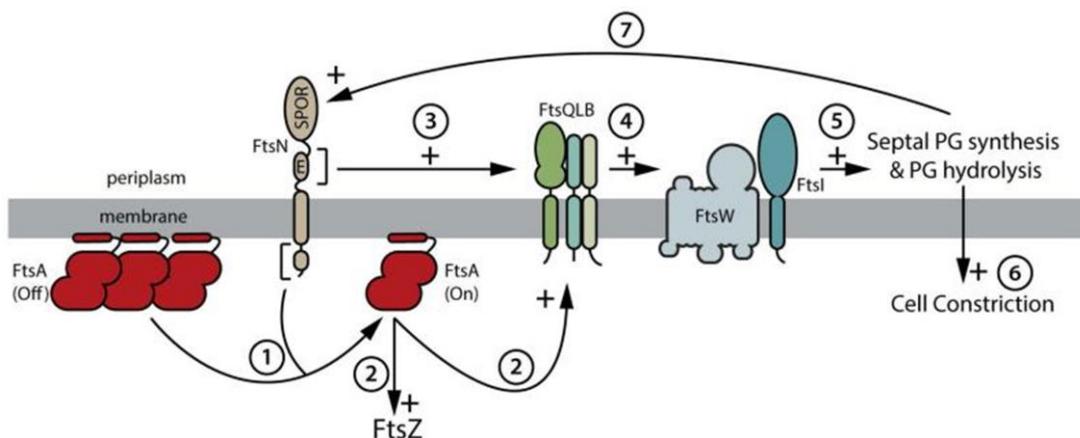


Figure I.37 : Modèle général de synthèse du sPG.

En bref, comme explicité dans le texte ci-dessus : FtsA dans l'état activé (monomérique) favorisé par la région cytoplasmique de FtsN, stabilisant FtsZ, mais qui agirait également sur FtsBLQ qui à son tour stimulerait l'activité de synthèse du sPG (1-2). Par ailleurs, le domaine essentiel de FtsN (E FtsN) communiquerait à FtsBLQ le statut du divisome pour activer la synthèse du sPG (3). FtsBLQ servirait d'intégrateur du signal venant de FtsA et de FtsN pour transmettre le signal d'activation, probablement par changement de conformation, au complexe FtsW-PBP3 (4). Après synthèse du sPG, constriction et action des amidases, davantage de FtsN, via son domaine SPOR, est recruté et amplifie le signal (5,6 et 7). L'action de FtsEX n'est pas représentée (Tsang & Bernhardt, 2015).

1.2.2.5 Le désassemblage du divisome

À la fin de la division, le divisome doit être désassemblé afin de permettre la dégradation ou le recyclage de ses constituants. L'étude de ce processus en microscopie, par l'intermédiaire de fusion à des protéines fluorescentes, a permis de comprendre la dynamique de désassemblage de cet édifice qu'est l'appareil de division. Il a été établi que FtsZ et ZapA quittent le divisome avant ZipA, FtsA, FtsK, FtsL, FtsQ et PBP3 (Wang *et al.*, 2005 ; Galli et Gerdes, 2010 ; Soderstrom *et al.*, 2014). Curieusement, le départ précoce de FtsZ et ZapA se produit avant que le cytoplasme ne soit scellé, indiquant ainsi que le désassemblage est initié alors que la constriction de la membrane est toujours en cours (Soderstrom *et al.*, 2014). Comme précédemment mentionné, FtsN aurait probablement un rôle dans la stabilisation du divisome, suggérant que son départ pourrait initier le désassemblage de ce dernier (Rico *et al.*, 2010). Cependant, dans les cellules en fin de constriction, FtsN quitte le divisome bien après FtsZ (Söderström *et al.*, 2016). En réalité, FtsA, ZipA, FtsQ et FtsL quittent le divisome avant FtsN (Söderström *et al.*, 2016). PBP3 quant à lui, semble se déplacer dans les deux cellules filles vers les futurs sites de divisions presque simultanément avec une petite partie de la population de FtsN et donc un peu après FtsL/FtsQ (Söderström *et al.*, 2016). En fait, la majorité de la population de FtsN ne migre pas vers les deux nouveaux futurs sites de divisions, mais persiste au site de division primaire plus tardivement (Söderström *et al.*, 2016). Il y a donc deux phases dans le processus de départ de FtsN du divisome : une petite quantité quittant le divisome avec PBP3 et la majorité de FtsN quittant le divisome en dernier en fin de division (Söderström *et al.*, 2016). Ceci n'est pas sans rappeler la phase de recrutement de FtsN qui est recruté en faible quantité précocement via FtsA puis s'accumulant tardivement en grande quantité pour déclencher la synthèse du sPG (Söderström *et al.*, 2016). En résumé, le désassemblage du divisome suit la hiérarchie suivante : [FtsZ] → [ZipA, FtsA] → [FtsL, FtsB, FtsQ] → [PBP3, FtsN] → [FtsN], présentant une forte ressemblance avec l'ordre de recrutement de ces constituants lors de la mise en place du divisome (Söderström *et al.*, 2016).

1.3 Les antibiotiques ciblant la biosynthèse PG

Étant donné son importance, le métabolisme du PG, incluant les enzymes de synthèse et les hydrolases, constituent une cible de choix pour le développement de composés antibiotiques. Par ailleurs, le transport et la disponibilité du Lipide II sont d'autres aspects importants pouvant être ciblé par des composés antibiotiques. Dans ce chapitre, il n'est pas question de réaliser une liste exhaustive de l'ensemble des antibiotiques ciblant le PG, mais plutôt de donner un aperçu des différentes classes d'antibiotiques ciblant le PG et de leur mode d'action sur ce dernier.

1.3.1 Les inhibiteurs des DD-transpeptidases

L'antibiotique le plus célèbre ciblant le PG est la pénicilline, un antibiotique de la classe des β -lactamines. Depuis sa découverte et son utilisation à partir des années 40, différentes nouvelles générations de β -lactamines ont été développées (**Figure I.38.A**). La cible des β -lactamines sont les PBPs. La sérine active du motif SxxK, intervenant dans la réaction de transpeptidation, réagit covalentiellement avec l'antibiotique et bloque l'enzyme pour une longue durée (Sauvage *et al.*, 2008). On distingue quatre groupes de β -lactamines : les pénicillines (ex. : amoxicilline), les céphalosporines (ex. : ceftaroline), les monobactames (ex. : aztréoname) et les carbapénèmes (ex. : imipénème) (Sauvage & Terrak, 2016) (**Figure I.38.A**). L'affinité des différentes β -lactamines vis-à-vis des différentes classes de PBPs varie d'une β -lactamine à l'autre (Sauvage & Terrak, 2016). Dans le groupe des céphalosporines, on retrouve notamment deux composés actifs sur les souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (une pénicilline) : la ceftaroline et la ceftobiprole. La ceftaroline montre une activité large spectre contre des bactéries à Gram positif et contre certaines bactéries à Gram négatif (Gharawi *et al.*, 2015). Dans les monobactames on retrouve notamment l'aztréoname ayant en particulier une forte affinité pour le bPBP de la division, comme le PBP3 de *P. aeruginosa* ou d'*E. coli*. Des fusions de monobactames avec des sidérophores ont été réalisées, afin de faciliter leur diffusion au travers de la membrane externe. Certaines de ces molécules hybrides montrent une activité contre différentes bactéries à Gram négatif tel que *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, ou encore *A. Baumannii* (Russo *et al.*, 2011 ; Landman *et al.*, 2014). Enfin, Les carbapénèmes sont souvent considérés comme les β -lactamines de dernier recours. Ils inhibent les DD et LD-transpeptidases, ces dernières catalysant le pontage 3-3 prédominant notamment chez *M. tuberculosis* (Lavollay *et al.*, 2008). Il faut noter qu'il existe des composés qui inhibent les PBPs en réagissant avec la sérine active, mais n'appartenant pas aux β -lactamines. On peut citer la lacticicine, et ses dérivés couplés à des sidérophores (Tamura *et al.*, 1990).

De nombreuses résistances aux β -lactamines sont apparues au fil des années, principalement liés à l'émergence d'enzymes hydrolysant le noyau β -lactame : les β -lactamases (**Figure I.38.B**) (Sauvage & Terrak, 2016). Au fil du temps, des β -lactamases, hydrolysant les différents groupes de β -lactamines et rendant les bactéries productrices résistantes, sont apparus (Sauvage & Terrak, 2016 ; Frère *et al.*, 2016). Néanmoins des inhibiteurs de β -lactamases ont été développés (acide clavulanique, avibactame...), ces derniers sont utilisés en combinaison avec des β -lactamines pour traiter des infections bactériennes (Sauvage & Terrak, 2016). On peut citer des combinaisons fréquemment utilisées chez les patients infectés : l'acide clavulanique avec une pénicilline telle l'amoxicilline, l'avibactame avec la ceftazidime ou encore l'aztréoname et le vaborbactame en combinaison avec le méropénème (Montravers & Bassetti ; 2018).

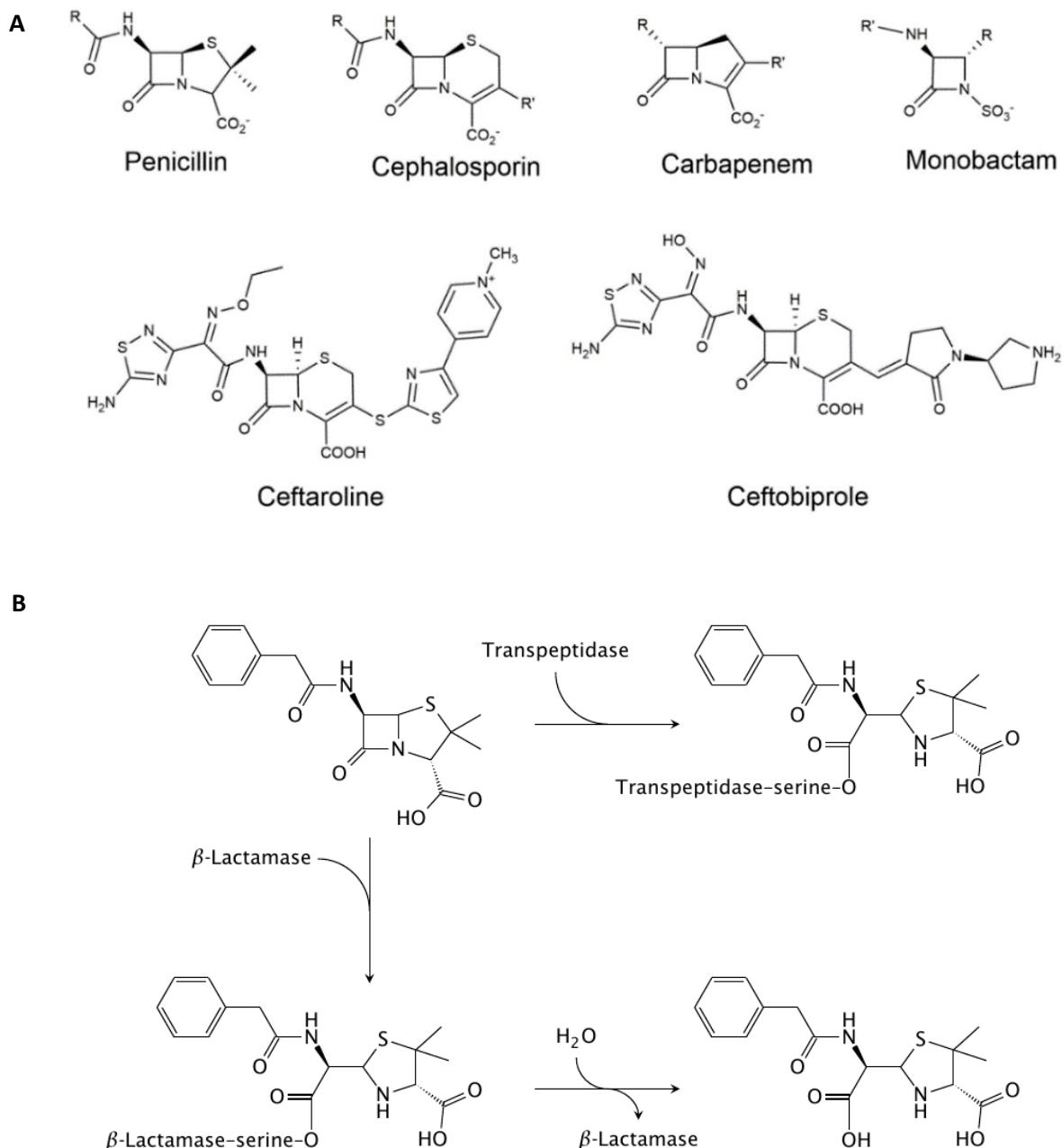


Figure I.38 : Exemples de β -lactamines (A) et mécanisme de réactions entre une pénicilline et la sérine d'un domaine PBP ou d'une β -lactamase (B).

Voir détails dans le texte ci-avant (Terrak & Sauvage, 2016).

1.3.2 Les inhibiteurs des glycosyltransférases (GTases)

Les GTases de la famille GT51 sont considérées comme une bonne cible pour le développement d'antibiotiques étant donné l'essentialité des aPBPs chez la plupart des bactéries. La moénomycine lie spécifiquement le domaine GTase (le site donneur), bloque l'activité de l'enzyme et montre un effet antibactérien (Lovering *et al.*, 2007 ; Di Berardino *et al.*, 1996 ; Sauvage & Terrak, 2016). Néanmoins, cette molécule, et aucun autre inhibiteur de GTase n'ont pu passer les tests pour être utilisés en médecine

humaine. La moénomycine est par contre utilisée comme additif dans l'élevage animal sans émergence de résistance majeure (Butaye *et al.*, 2000). La moénomycine A est composée d'un chromophore et d'un penta-saccharide lié à un lipide (moénocinyl, C25) via un groupement phosphoglycérate. Cette structure mime une chaîne de PG en croissance et est illustrée en **annexe 1** (Welzel *et al.*, 2005). La structure minimale pour conserver l'activité antibactérienne et l'inhibition des GTases est le trisaccharide-phosphoglycérate-lipide (Welzel *et al.*, 2005 ; Fuse *et al.*, 2010 ; Lovering *et al.*, 2008). Les bactéries à Gram négatif sont moins sensibles à la moénomycine étant donné la perméabilité limitée de l'antibiotique vis-à-vis de la membrane externe (Sauvage & terrak, 2016).

Différents analogues basés sur la structure de la moénomycine et du Lipide II ont été développés : des analogues disaccharides, ou encore des analogues mimant la structure de transition du Lipide II pendant la réaction de transglycosylation, menant à la découverte de composés inhibant l'activité de GTase (Zuegg *et al.*, 2015 ; Hsu *et al.*, 2014, Dumbre et al 2012). Par ailleurs, différents tests de criblage, certain à haut débit (HTS), exploitant du FRET avec un analogue de Lipide II, de l'anisotropie de fluorescence avec un dérivé fluorescent de la moénomycine, du criblage virtuel de banques de molécules, ou encore des tests haut débit *in vivo*, ont menés à l'identification des plusieurs structures moléculaires inhibant l'activité GTase (Cheng *et al.*, 2008 & 2010 ; Huang *et al.*, 2013 ; Derouaux *et al.*, 2011, Sauvage & Terrak 2016). Des structures d'inhibiteurs de la famille GT51 sont reprises en **annexe 1**.

La découverte de l'activité GTase des protéines FtsW et RodA, insensible à la moénomycine, ouvre de nouvelles possibilités quant au développement de molécules ciblant la synthèse du PG.

1.3.3 Les inhibiteurs des enzymes cytoplasmiques de la biosynthèse du PG : MurA-F

Il existe un grand nombre de molécules inhibant l'activité des enzymes MurA-F, dont certaines avec de très hautes affinités pour ces enzymes (Sangshetti *et al.*, 2017). On peut citer : les benzothioxalones, des dérivés de purines et de pyrimidines, des dérivés de naphtalène, des dérivés d'imidazoles, des dérivés de quinolone, ou encore des peptides (Sangshetti *et al.*, 2017). Certains de ces composés présentent une activité antibactérienne, presque exclusivement sur les bactéries à Gram positif, la membrane externe constituant une barrière de perméabilité pour la plupart de ces composés (Gupta *et al.*, 2016 ; Sangshetti *et al.*, 2017). Certains composés présentent une spécificité pour un type de protéine Mur : c'est le cas de la fosfomycine. Cette molécule est un analogue du phosphoenolpyruvate inhibant spécifiquement MurA, l'enzyme catalysant la première étape cytoplasmique de la synthèse du PG, à savoir la formation de MurNAc (Sangshetti *et al.*, 2017 ; Díez-Aguilar & Cantón, 2019). Bien que découverte il y a environ 40 ans, il a été mis en évidence que la fosfomycine permet, en combinaison avec différentes β-lactamines, de lutter efficacement contre différentes souches bactériennes résistantes comme les MRSA (Del Río *et al.*, 2016). Par ailleurs certaines molécules ont été développées pour cibler plusieurs protéines Mur simultanément (Silver, 2007 ; Perdih *et al.*, 2015 ; Sangshetti *et al.*, 2017).

1.3.4 Les inhibiteurs des autres phases membranaires : MurG, MraY, MurJ et les UppS/UppP

Des inhibiteurs de MraY ont été étudiés, principalement des analogues de composés naturels tels que la mureidomycine A et la tunicamycine, des antibiotiques de type uridyl-peptide (Howard & Bugg, 2003). Ces

molécules agissent selon différents mécanismes *in vitro* et certains montrent des activités antibactériennes principalement contre des bactéries à Gram positif (Brandish *et al.*, 1996a & 1996b ; Tanino *et al.*, 2011). Concernant les inhibiteurs ciblant MurG, la recherche d'analogue de substrat n'a pas permis d'identifier beaucoup de composés actifs sur les bactéries, car ne pouvant pas atteindre leur cible MurG (Hu *et al.*, 2004 ; Liu & Breukink, 2016). Le seul composé identifié est le dérivé de stéroïde appelé murgocil qui se lie spécifiquement à MurG et qui montre une activité anti-staphylocoque (Mann *et al.*, 2013). La possibilité d'étendre l'utilisation de cette molécule (ou analogues) à d'autres bactéries à Gram positif ou même à des bactéries à Gram négatif semble limitée étant donné que l'activité de cet antibiotique dépend fortement de résidus uniques retrouvés dans le MurG des staphylocoques (Mann *et al.*, 2013 ; Liu & Breukink, 2016). Concernant MurJ, il a été montré qu'une protéine virale, Lys^M bloque MurJ dans la conformation soit ouverte vers le cytoplasme soit vers le périplasme et empêche donc le flip du Lipide II (Butler *et al.*, 2013 ; Kuk *et al.*, 2017 ; Butler *et al.*, 2014 ; Chamakura *et al.*, 2017). Il s'agit du troisième exemple de protéine virale antibiotique ciblant la synthèse du PG, deux autres ayant été décrites comme ciblant MurA et MraY (Bernhardt *et al.*, 2001a & 2001b). Une meilleure compréhension du mécanisme d'inhibition pourrait servir de base au développement de molécules ciblant MurJ.

L'étape de déphosphorylation du C55-PP constitue également une cible pour des molécules antibiotiques. Il avait été montré que le phenylthiazole exerçait une activité antibactérienne en ciblant l'undécaprényle pyrophosphate phosphatase (UppP) et dans une moindre mesure l'undécaprényle pyrophosphate synthétase (UppS) (Hagras *et al.*, 2018). Par la suite, deux dérivés de phenylthiazole contenant un groupement thiophène ont montré un effet inhibiteur accru contre l'UppP et aucun effet contre l'UppS (Elsebaei *et al.*, 2019). Ces dérivés sont notamment actifs contre les MRSA (Elsebaei *et al.*, 2019). Le Climophène a été identifié comme un inhibiteur des UppS, il s'agit initialement d'un modulateur non stéroïdien des récepteurs à l'estrogène (Pfeifer *et al.*, 2013). Cet inhibiteur a pour effet de diminuer le « pool » de C55-P et d'affecter ainsi la synthèse du PG, mais aussi des acides teichoïques chez les bactéries à Gram positif (Farha *et al.*, 2015). Cette molécule permet d'augmenter l'effet de toutes les β-lactamines sur les MRSA (Farha *et al.*, 2015). D'autres structures moléculaires inhibant les UppS ont pu être identifiées. Beaucoup de ces molécules ont un groupement hydrophobe et certaines possèdent un groupement polaire qui occupe la place du groupement pyrophosphate du substrat naturel, comme c'est le cas des inhibiteurs présentant un groupement bisphosphonate (Guo *et al.*, 2007). Des dérivés d'acides anthracéniques (Jukic *et al.*, 2019) ou encore des dérivés de pyrazoles (Concha *et al.*, 2016) ont pu être mis en évidence en tant qu'inhibiteurs des UppS. Cependant, les activités antimicrobiennes associées sont assez modestes (Concha *et al.*, 2016 ; Jukic *et al.*, 2019).

1.3.5 Les inhibiteurs d'hydrolases

La bulgécine A est un inhibiteur de transglycosylase lytique, et en particulier, chez *E. coli*, elle inhibe l'enzyme Slt70 (Bonis *et al.*, 2012 ; Templin *et al.*, 2017). Cette molécule est formée d'un groupe 4-O-sulfonyl-N-acétylglucosamine lié en β 1-4 avec la 4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-L-proline relié à la taurine (Williams *et al.*, 2017). On observe une synergie de cette molécule avec différentes β-lactamines, par exemple, la bulgécine A restaure l'efficacité de la pénicilline G et de l'amoxicilline contre *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* ou encore augmente l'efficacité de carbapénème contre des souches de *P. aeruginosa* et *A. baumannii* résistantes aux carbapénèmes (Thunnissen *et al.*, 1995 ; Bonis *et al.*, 2012 ; Skalweit *et al.*, 2016 ; Templin *et al.*, 2017 ; Williams *et al.*, 2017).

La complestatine et la corbomycines sont des glycopeptides produits par des bactéries du genre *Streptomyces* et présentant une activité antibactérienne (Culp *et al.*, 2020). Ces composés sont actifs contre les bactéries à Gram positif dont des MRSA résistant à la daptomycine (voir après). Il a été démontré récemment que la complestatine et la corbomycines agissent de la même manière, selon un nouveau mécanisme : ces molécules lient le PG et bloquent son accès aux différentes hydrolases (Culp *et al.*, 2020).

1.3.6 Les molécules séquestrant le Lipide II

Le Lipide II, précurseur membranaire final de la synthèse du PG, constitue une cible de choix, et ce, à de multiples égards. Évidemment, la séquestration du Lipide II bloque toutes les étapes ultérieures de la voie de biosynthèse du PG. De plus, le Lipide II est très largement conservé dans le monde bactérien et on ne retrouve pas de contrepartie chez les eucaryotes. Par ailleurs, il se retrouve également exposé au périplasme et est donc plus aisément accessible à d'éventuels antibiotiques, comparativement aux cibles cytoplasmiques. Par ailleurs, on s'est rendu compte que le Lipide II jouait également un rôle dans l'organisation de la membrane cytoplasmique et même dans certaines voies de transduction du signal (Hardt *et al.*, 2017). En outre, le Lipide II offre, malgré sa taille limitée, plusieurs sites d'interactions pour d'éventuels antibiotiques : Le disaccharide GlucNAc-MurNAc, le peptide, le groupement pyrophosphate et l'undécaprényle. De plus, ce dernier est également utilisé comme transporteur d'autres constituants comme les précurseurs des acides teichoïques, cruciaux chez les bactéries à Gram positif (Müller *et al.*, 2017). À ce jour, différentes molécules développées par des microorganismes et se liant au Lipide II ont été identifiées. Il faut noter que beaucoup de ces molécules agissent en premier lieu sur la membrane dans laquelle elle forme notamment des pores (Müller *et al.*, 2017). Bien que ces molécules soient assez diversifiées, une caractéristique commune se dégage : il s'agit, pour la plupart, de peptides amphiphiles globalement chargés positivement (Chugunov *et al.*, 2013). Un aperçu des structures moléculaires est présenté à la fin de ce chapitre (**Figure I.39**).

1.3.6.1 Les glycopeptides

La vancomycine (**Figure I.39.A**) et teicoplanine sont des glycopeptides naturellement produits par certains actinomycètes via le système NRPS (« Non-ribosomal peptide synthetase ») (Müller *et al.*, 2017). La liaison de la vancomycine au Lipide II se réalise par l'intermédiaire de cinq liaisons hydrogène avec le D-Ala-D-Ala (Müller *et al.*, 2017). Étant donné l'encombrement stérique, le complexe ainsi formé ne peut être pris en charge par les synthases du PG (Reynolds, 1989). La vancomycine est capable de former des dimères et un dimère de vancomycine chimiquement stabilisé a une activité plus importante contre les souches résistantes d'entérocoque (Nicolaou *et al.*, 2001). En effet, des résistances sont apparues chez les staphylocoques et les entérocoques suite à une modification de la D-Ala terminale du Lipide II en D-lactate ou D-Ser, diminuant l'affinité de la vancomycine pour sa cible (Arthur & Courvalin, 1993 ; Severin *et al.*, 2004). La teicoplanine a une structure proche de la vancomycine, mais possède une activité antibactérienne plus forte que la vancomycine : ceci est attribué à la présence d'une chaîne lipidique facilitant son insertion dans la membrane et amenant l'antibiotique proche de sa cible (Greenwood *et al.*, 1987 ; Chmara *et al.*, 1991). Sur base de cette observation, d'autres glycopeptides semi-synthétiques ont été générés en modifiant la vancomycine et la teicoplanine par ajout d'une chaîne lipidique. On peut citer

la telavancine, dalbavancine montrant notamment une activité accrue contre des souches d'entérocoques résistantes à la vancomycine (Malabarba *et al.*, 1995 ; Leadbetter *et al.*, 2004 ; Zhan et *al.*, 2010).

1.3.6.2 Les lipopeptides

Les lipopeptides sont des composés naturels composés d'un court oligopeptide (2 à 25 AA) et d'une chaîne lipidique à l'extrémité N-terminale. Une cyclisation peut être présente en impliquant, soit deux acides aminés, soit un acide aminé et la chaîne lipidique (Müller *et al.*, 2017). Un grand nombre de lipopeptides liant le Lipide II sont chargés négativement et se lient au Ca^{2+} , fort probablement via le motif Asp-x-Asp-Gly retrouvé dans bon nombre de lipopeptides (Bunkócz et *al.*, 2005). Cette liaison masque leur charge négative et ainsi augmente leur affinité pour le Lipide II. De plus, la liaison du Ca^{2+} induit généralement des modifications conformationnelles augmentant le caractère amphiphile de la molécule, une caractéristique importante des molécules liant le Lipide II (Schneider *et al.*, 2009). Les lipopeptides sont actifs sur les bactéries à Gram positif et notamment sur des souches multirésistantes (Müller *et al.*, 2017). Le mode d'action des lipopeptides est encore sujet à investigation. De manière générale, l'effet antibiotique de ces molécules est attribué à la fois à l'effet perturbateur sur la membrane bactérienne et, pour certaines, à la liaison à différentes parties du Lipide II (Straus *et al.*, 2006). Comme exemple de lipopeptide antibiotique, on peut citer : la ramoplanine (glycolipopeptide), la tripropeptin C, la tridecaptin A1, ou encore le lipopeptide anionique appelé daptomycine (Straus *et al.*, 2006, Müller *et al.*, 2017). La ramoplanine lie le Lipide II (complexe 2 : 1), et le séquestre, en établissant des interactions avec le groupement pyrophosphate et le MurNAc (Fang *et al.*, 2006 ; Cudic *et al.*, 2002). La ramoplanine forme également un dimère amphiphile facilitant ainsi son interaction avec la membrane bactérienne (Müller *et al.*, 2017). La tripropeptin C formerait un complexe avec le C55-PP et inhibrait notamment les undecaprenyl pyrophosphate phosphatases (UPPs) à l'instar de la bacitracine, un oligopeptide (Hashizume *et al.*, 2011). La daptomycine associée au Ca^{2+} forme un complexe tripartite avec les précurseurs contenant le C55-P (tel le Lipide II) et le PG naissant (Grein *et al.*, 2020). La tridecaptin A1 (TriA1) et les analogues montrent une bonne activité et sélectivité contre les bactéries à Gram négatif incluant des souches multirésistantes de *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* et *Acinetobacter baumannii*. Ceci est expliqué par le mode d'action de cet antibiotique. D'une part, il interagit avec les LPS, permettant de déstabiliser la membrane externe (Cochrane *et al.*, 2016). D'autre part, il interagit principalement avec le mDAP du Lipide II dans un rapport 1 : 1 (Cochrane *et al.*, 2016).

1.3.6.3 Les lantibiotiques

Les lantibiotiques, agissant principalement sur les bactéries à Gram positif, sont des peptides polycycliques modifiés contenant généralement les acides aminés meso-lanthionine (Lan) et 3-méthyllanthionine (MeLan) (Sahl & Bierbaum, 1998). Une centaine de lantibiotiques ont été décrits dont la Nisine et la mersacidine qui constituent les deux structures types dans lesquelles sont classées les lantibiotiques (Sahl & Bierbaum, 1998, Bierbaum & Sahl 2009). Les lantibiotiques de « type mersacidine » présentent une structure globulaire, sont chargés négativement, lient le Ca^{2+} et inhibent l'utilisation du Lipide II en interagissant principalement avec le pyrophosphate, mais n'ont pas d'effet significatif sur l'intégrité de la membrane (**Figure I.39.D**) (Schneider *et al.*, 2000 ; Hsu *et al.*, 2003 ; Wiedemann *et al.*, 2006). Les lantibiotiques de « type nisine » sont plutôt flexibles, allongés et forment des pores dans la membrane qui sont initiés par la partie C-terminale de la molécule (**Figure I.39.C**) (Breukink *et al.*, 1997).

Le site de liaison primaire de la nisine est également le groupement pyrophosphate, mais l'undécaprényle et le MurNAc participeraient également dans une moindre mesure dans l'interaction Lipide II-nisine (Müller *et al.*, 2012 ; Hart *et al.*, 2016). La nisine est utilisée comme conservateur dans l'industrie alimentaire (Rayman *et al.*, 1981).

1.3.6.4 Les défensines

Les défensines sont des peptides, de 3500 à 6000 Da, produits par de nombreux organismes (plantes, animaux et champignons) (**Figure I.39.E**) (Ulm *et al.*, 2015 ; Schmitt *et al.*, 2010 ; Wilmes *et al.*, 2011). Les défensines des plantes, des champignons et des invertébrés présentent une structure conservée : une hélice α liée, via des ponts disulfures à deux brins β antiparallèles (Mygind *et al.*, 2005 ; Dias & Franco, 2015). Ces dernières sont actives contre les bactéries à Gram négatif. Au contraire, les défensines des vertébrés agissent sur un large spectre de bactéries à Gram positif et négatif (Wilmes *et al.*, 2011 ; Mygind *et al.*, 2005 ; Schneider *et al.*, 2010). On distingue trois sous-familles de défensines avec des structures qui varient quelque peu, mais qui présentent toujours trois ponts disulfures stabilisant leur structure (Müller *et al.*, 2017). De nombreuses défensines agissent en formant des pores dans la membrane, mais certaines se lient spécifiquement au Lipide II (Müller *et al.*, 2017). La première défensine décrite comme liant le Lipide II est la plectasine (40 AA), produite par le champignon *Pseudoplectania nigrella* et très active contre beaucoup de bactéries à Gram positif (Mygind *et al.*, 2005 ; Schneider *et al.*, 2010). L'interaction avec l'UDP-MurNAc est cruciale, mais la N-acétylglucosamine est aussi requise (Schneider *et al.*, 2010). De plus, des interactions entre le peptide et l'undécaprényle ont également été mises en évidence (Müller *et al.*, 2017). HNP-1 est une défensine produite par des vertébrés et capable de lier le Lipide II qui a cependant dix fois plus d'affinité pour la Lipide II comparativement à la plectasine et présente une activité sur les bactéries à Gram positif et négatif (Varney *et al.*, 2013). Des études d'interactions entre HNP-1 et le Lipide II ont permis la synthèse des défensines synthétiques dont le composé BAS00127538 présentant une haute affinité et spécificité pour le Lipide II. Ce dernier interagirait avec le groupement pyrophosphate, la partie proximale de l'undécaprényle et le MurNAc (Varney *et al.*, 2013 ; Fletcher *et al.*, 2015).

1.3.6.5 La teixobactine

La teixobactine (**Figure I.39.B**) est produite par la bactérie Gram négatif *Eleftheria terrae* et est le premier membre d'une nouvelle classe d'antibiotique (Ling *et al.*, 2015). Il s'agit d'un peptide de 11 AA composé d'une chaîne linéaire de sept résidus et d'un cycle constituant la région C-terminal (Ling *et al.*, 2015, Müller *et al.*, 2017). La teixobactine contient en outre quatre acides aminés de type D et l'acide aminé appelé la L-allo-enduracididine (Ling *et al.*, 2015 ; Atkinson *et al.*, 2016). Cet antibiotique est très actif contre de nombreuses souches multirésistantes, mais inactif contre les bactéries à Gram négatif, car il est incapable de franchir la membrane externe (Ling *et al.*, 2015). L'interaction teixobactine-Lipide II se ferait avec une stoechiométrie 2 :1, principalement via une interaction avec le groupement pyrophosphate (Ling *et al.*, 2015). Il est à noter que contrairement à beaucoup d'antibiotiques liant le Lipide II, la teixobactine n'est pas très chargée positivement et son insertion dans la membrane n'est pas essentielle à son activité (Müller *et al.*, 2017).

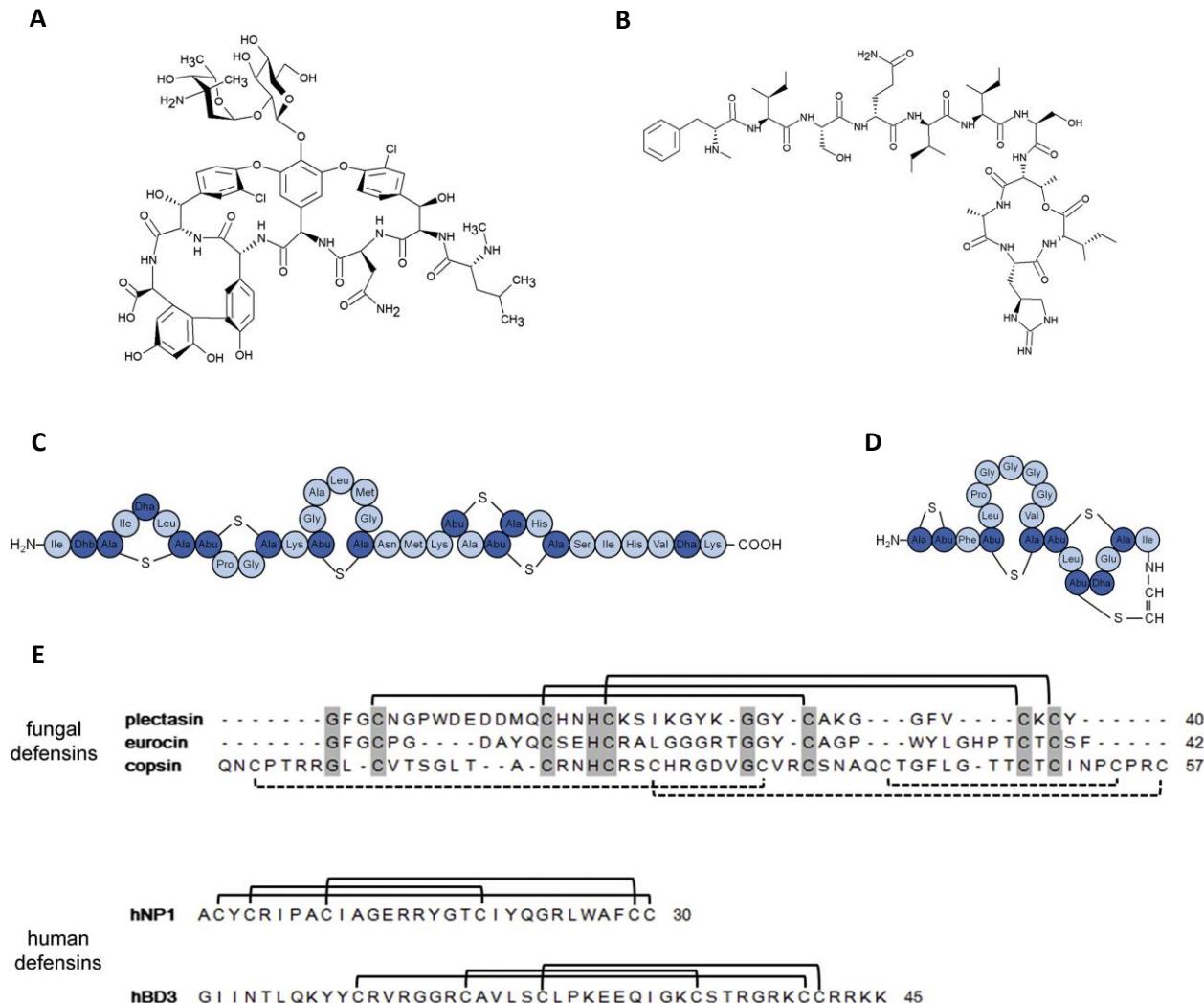


Figure I.39 : Exemples de structures des différentes classes de molécules liant le Lipide II.

La vancomycine (**A**), la teixobactine (**B**), la nisine (**C**), la mersacidine (**D**), structures primaires de différentes défensines (**E**).

(Grein, et al., 2019).

II. Objectifs

Les études du divisome ont montré diverses interactions binaires, parfois en utilisant des formes tronquées, entre les protéines qui composent ce complexe multiprotéique. Il est largement accepté que le fonctionnement du divisome est régulé par de multiples interactions, qui jouent parfois un rôle synergique ou s'opposent entre elles, pour permettre une synthèse coordonnée du PG septal dans l'espace et dans le temps. Pour mieux comprendre ces mécanismes, nous étudierons les interactions, dans différentes combinaisons, entre protéines et sous complexes du divisome : d'une part, les synthases FtsW-PBP3-PBP1b, et d'autre part, le complexe FtsBLQ et FtsN qui jouent, potentiellement, un rôle régulateur dans la biosynthèse du PG septal.

Pour ce faire, nous opterons pour la co-expression d'un sous-groupe de protéines (dont une seule porte un tag de purification) sous forme membranaire et native, afin de permettre leur reconstitution dans la membrane cytoplasmique à l'aide des plasmides pETDuet. Les complexes formés seront ensuite extraits et co-purifiés sur colonne d'affinité.

Sur bases des interactions identifiées, des tests d'activité de biosynthèse du PG *in vitro* seront réalisés afin de comprendre l'effet des interactions sur l'activité de biosynthèse du peptidoglycane septal : à la fois l'activité GTase et TPase des enzymes de synthèse. Nous aurons pour but en particulier de comprendre les rôles de FtsBLQ et FtsN, semblant étroitement liés, dans le processus de régulation de la biosynthèse du sPG.

La protéine FtsN est la dernière protéine à se localiser au site de division et provoque le déclenchement de la biosynthèse du PG septal et la constriction de la cellule. Afin de mieux comprendre son mode d'action et sa cible au sein du divisome, nous aurons comme objectif d'étudier spécifiquement sa structure (sous forme complète ou tronquée) en présence d'autres partenaires identifiés.

Enfin, nous explorerons les possibilités d'utiliser les protéines étudiées dans ce travail et le substrat Lipide II pour développer un test de criblage d'inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi bactérienne.

III. Matériels et méthodes :

1 Matériaux

1.1 Souches bactériennes

Souche bactérienne	Génotype	Description
<i>E. coli</i> Mach1	$\Delta recA1398$ $endA1$ $fhuA$ $\Phi 80\Delta(lac)M15 \Delta(lac)X74 hsdR(r_K^- m_K^+)$	Cette souche, dérivée de la souche ATCC 9637, mais dépourvue d'endonucléase et de recombinase, est utilisée pour l'amplification de l'ADN plasmidique.
<i>E. coli</i> C43 (DE3)	F- $ompT$ gal dcm $hsdSB$ (rB - mB -) (DE3)	Cette souche est dérivée de la souche BL21 (DE3) et porte donc le lysogène lambda DE3 codant pour l'ARN polymérase du phage T7 sous le contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG. Cette souche a été sélectionnée pour sa capacité à surexprimer des membranes intracellulaires et est donc utilisée pour la surexpression de protéines membranaires (Miroux & Walker, 1996).
<i>E. coli</i> Lemo21 (DE3)	$fhuA2$ [lon] $ompT$ gal (λ DE3) [dcm] $\Delta hsdS$ / pLemo(CamR) Plasmide pLemo : pACYC184-PrhaBAD-lysY	Cette souche est dérivée de la souche BL21 (DE3) et possède un plasmide pLemo permettant d'induire, par le rhamnose, le lysozyme Y, inhibant la T7 polymérase permettant de réguler plus finement l'expression de la protéine d'intérêt sous le contrôle du promoteur T7.
<i>E. coli</i> EJ801	F- lac $strA$ $tonA$ $metB$ $proA$ tsx $ponA1104$ $ponB1085$ $dacAll91$ $dacB12$	Cette souche est dérivée de la souche JE5702. Elle est dépourvue du PBP1b et possède un PBP1a thermosensible (Hara & Suzuki, 1984).

1.2 Plasmides et oligonucléotides

- Les vecteurs pETDuet-1 et pRSFDuet-1 (Novagen), porteurs respectivement d'une résistance à l'ampicilline et à la kanamycine, sont des vecteurs présentant deux sites de clonage multiple (MCS), tous deux précédés d'un promoteur T7, de la séquence opératrice *lac* et d'un RBS (« Ribosome Binding Site »). Une séquence codant pour six histidines (His-tag) est située en amont du MCSI.

- Le vecteur pET22b (Novagen), porteur d'une résistance à l'ampicilline, d'un promoteur T7, de la séquence opératrice *lac* et d'un RBS. On retrouve également la séquence codant pour le peptide signal *peB* permettant le transport de la protéine vers le périplasme. Ce plasmide permet en outre l'expression d'une protéine avec un His-tag C-terminal.
- Le pET28a (Novagen), porteur d'une résistance à la kanamycine, d'un promoteur T7, de la séquence opératrice *lac* et d'un RBS. Ce plasmide permet l'expression d'une protéine avec un His-tag N-terminal clivable à la thrombine et un potentiel His-tag C-terminal.

Nom du plasmide / code interne	Description
pDML924	pET28a-His-PBP1by (Terrak <i>et al.</i> , 1999)
pDML2400	pET28a-His-FtsW (Pastoret <i>et al.</i> , 2004)
pDML2041	pETDuet-His-FtsW / PBP3 (Leclercq <i>et al.</i> , 2017)
pCIP1000	pETDuet-His-FtsW / PBP1by (Leclercq <i>et al.</i> , 2017)
pCIP1051a	pETDuet-His-MurJ (tag clivable à la TEV) (Leclercq <i>et al.</i> , 2017)
pDML2032	pET22b-FtsN-His (Leclercq <i>et al.</i> , 2017)
pET22b- <i>ftsN</i> -His (W83L) / pABM8.2	pET22b-FtsN ^{W83L} -His
pET22b- <i>ftsN</i> -His (Y85W) / pABM8.1	pET22b-FtsN ^{Y85W} -His
pRSF-His <i>ftsBLQ</i> / pAB3	pRSF-His-FtsB/FtsL/FtsQ
pRSF-His <i>ftsBL</i> *Q / pAB4	pRSF-His-FtsB/FtsL*/FtsQ (* S3N, R4K et V5L dans FtsL)
pRSF-His <i>ftsBL</i> *Q- <i>ftsN</i> / pAB23	pRSF-His-FtsB / FtsL*/FtsQ / FtsN
pRSF-His <i>ftsBL</i> *Q- <i>ftsW</i> / pAB36	pRSF-His-FtsB / FtsL*/FtsQ / FtsW
pRSF-His <i>ftsBL</i> *Q- <i>ftsW_{HA}</i> / pAB37	pRSF-His-FtsB / FtsL*/FtsQ / FtsW _{HA}
pRSF-His <i>ftsBL</i> *Q- <i>ftsI</i> / pAB38	pRSF-His-FtsB / FtsL*/FtsQ / PBP3
pRSF-His <i>ftsBL</i> *Q- <i>ponB</i> / pAB41	pRSF-His-FtsB / FtsL*/FtsQ / PBP1by
pRSF-Strep <i>ftsBL</i> *Q / pAB7.2	pRSF-Strep-FtsB / FtsL*/FtsQ
pRSF-His <i>ftsW</i> - <i>ftsN</i> / pAB48	pRSF-His-FtsW / FtsN
pDuet-His <i>ftsN</i> - <i>ponB</i> / pAB49	pDuet-His-FtsN / PBP1by

pRSF-His ⁺ <i>ftsBL</i> / pAB44	pRSF-His-FtsB / FtsL [*]
pRSF-His ⁺ <i>ftsQ</i> / pAB28	pRSF-His-FtsQ
pRSF-His ⁺ <i>ftsBQ</i> / pAB45	pRSF-His-FtsB-FtsQ
pRSF-His ⁺ <i>ftsLQ</i> / pAB46	pRSF-His-FtsL [*] -FtsQ
pRSF-His ⁺ <i>ftsBL-ponB</i> / pAB53	pRSF-His-FtsB / FtsL [*] / PBP1by
pRSF-His ⁺ <i>FtsQ-ponB</i> / pAB54	pRSF-His-FtsQ / PBP1by
pRSF-His ⁺ <i>ftsBLQ</i> (FtsB E56A) / pABM9	pRSF-His-FtsB ^{E56A} / FtsL [*] / FtsQ
pRSF-His ⁺ <i>ftsBLQ</i> (FtsB E56K) / pABM23	pRSF-His-FtsB ^{E56K} / FtsL [*] / FtsQ
pRSF-His ⁺ <i>ftsBLQ</i> (FtsB D59H) / pABM25	pRSF-His-FtsB ^{D59H} / FtsL [*] / FtsQ
pRSF-His ⁺ <i>ftsBLQ</i> (FtsL [*] D93A) / pABM10	pRSF-His-FtsB / FtsL ^{*D93A} / FtsQ
pRSF-His ⁺ <i>ftsBLQ-ponB</i> (FtsL [*] D93A) / pABM12	pRSF-His-FtsB / FtsL ^{*D93A} / FtsQ / PBP1by
pDML924 (S510A)	pET28a-His-PBP1by (S510A) (Leclercq <i>et al.</i> , 2017)
pRSF-TwinStrep ⁺ <i>ftsBLQ</i> / pAB56	TwinStrep-FtsB / FtsL [*] /FtsQ
pDuet-His ⁺ <i>ftsW</i> - <i>ftsI</i> kp / pAB75	pDuet-HisFtsW-PBP3 (de <i>Klebsiella pneumoniae</i>)
pDuet-His ⁺ <i>ftsI</i> kp- <i>ftsW</i> kp / pAB76	pDuet-HisPBP3-FtsW (de <i>Klebsiella pneumoniae</i>)
pET28a- <i>ponB</i> (K58-S804) / pAB86	His-PBP1b (K58-S804) avec tag clivable à la thrombine
pET22b- <i>ftsN</i> 130His / pAB57	pET22b-FtsN130-His
pDuet-His ⁺ <i>ftsN</i> 130- <i>ponB</i> / pAB60	pDuet-HisFtsN130-PBP1by
pTK1A	His-PBP1A (Born <i>et al.</i> , 2006)
pDML2494	His-PBP3 (Piette <i>et al.</i> , 2004)
pDML924 (T140A) / pABM26	pET28a-His-PBP1by (T140A)
pDML924 (R141A) / pABM27	pET28a-His-PBP1by (R141A)
pDML924 (R397A) / pABM29	pET28a-His-PBP1by (R397A)
pDML924 (T140A/R141A) / pABM30	pET28a-His-PBP1by (T140A/R141A)
pDML924 (T140A/R397A) / pABM31	pET28a-His-PBP1by (T140A/R397A)
pDML924 (R141A/R397A) / pABM28	pET28a-His-PBP1by (R141A/R397A)

pDuet-HisftsN- <i>ftsl</i> / pAB77	pDuet-His-FtsN-PBP3
pDuet-HisftsN130- <i>ponB</i> (K58-S804) / pAB62	pDuet-His-FtsN130 / PBP1b(K58-S804)
pRSF-HisftsBL [*] - <i>ftsW</i> / pAB51	pRSF-HisFtsB/ FtsL [*] / FtsW
pRSF-HisftsQ- <i>ftsW</i> / pAB55	pRSF-HisFtsQ / FtsW
pDuet-HisftsN- <i>ponB</i> γ (Y85W) / pABM8.3	pDuet-His-FtsN-PBP1b γ (Y85W)
pDuet-HisftsN- <i>ponB</i> γ (W83L) / pABM8.4	pDuet-His-FtsN-PBP1b γ (W83L)

La carte des plasmides commerciaux, les détails de la réalisation des constructions et les oligonucléotides utilisés (obtenus d'Eurogentec, Angleur) sont repris en **annexe 2 et 3**.

1.3 Purification d'ADN

- L'extraction et la purification des plasmides ont été réalisées à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). La purification des produits PCR et des produits des digestions ont été réalisées à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) après purification sur gel d'agarose.

1.4 Milieux de culture

- Le milieu LB (Luria-Bertani) : 10 g/L de bactotryptone (Difco), 5 g/L d'extrait de levure (Difco) et 10 g/L de NaCl. Le LB agar a la même composition que le milieu liquide et supplémenté par 20 g/L d'agar. Le milieu LB_{0.5} est un milieu LB modifié avec une concentration en NaCl de 0,5 g/L.
- Le milieu SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) : 20 g/L de bactotryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 0,6 g/L de NaCl, 1,9 g/L de KCl, 2 g/L de MgCl₂, 2,5 g/L de MgSO₄ et 4 g/L de glucose. Ce milieu est utilisé pour la croissance des cellules bactériennes après transformation avec un plasmide.
- Le milieu TB (Terrific Broth) : 12 g de bactotryptone et 24 g d'extrait de levure dans 890 mL d'eau distillée additionnée de 10 mL de glycérol 40 % et 100 mL de tampon phosphate (17 mM KH₂PO₄ et 95 mM K₂HPO₄).
- Le milieu 2xYT : 16 g/L de bactotryptone, 10 g/L d'extrait de levure et 5 g/L NaCl.

1.5 Antibiotiques

- L'ampicilline (MP Biomedicals), le chloramphénicol (Sigma-Aldrich), la kanamycine (MP Biomedicals) ont été utilisés respectivement à 100 µg/mL, 34 µg/mL, 50 µg/mL.

1.6 Détergents, réactifs et enzymes

Composé	Fournisseur
DM (n-Decyl-β-D-maltopyranoside)	Anatrace
DDM (n-Dodécyl-β-D-maltopyranoside)	Inalco
CHAPS 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)	Abcam
Polyéthylène glycol décyl éther	Sigma Aldrich
SDS (Dodécyl Sulfate de Sodium)	SERVA Electrophoresis GmbH
EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide)	ThermoFisher
Le thioester S2d	produit comme décrit dans Adam <i>et al.</i> , 1990
4,4'-dithiodipyridine	Sigma Aldrich
Lipide II – NBD (nitrobenzoxadiazole)	Eefjan Breukink
Lipide II – dansyl	Eefjan Breukink et Thierry touzé
[¹⁴ C]-Lipide II	Eefjan Breukink et Thierry touzé
Moénomycine A	Sanofi-Aventis, Romainville
L’IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside)	Sigma Aldrich
Rhamnose	VWR
Bromure d’éthidium	VWR
Sulfate d’ammonium	VWR
Isopropanol	Sigma Aldrich
Méthanol	VWR
Glutaraldéhyde 25%	Sigma Aldrich
Ammoniaque 25 %	Fluka
Formaldéhyde 37 %	Merck
Thrombine	Novagen
Protéase TEV (Tobacco Etch Virus)	Produite et purifiée au CIP
N-acétylmuramidase (<i>Streptomyces globisporus</i>)	Sigma Aldrich
Benzonase	Novagen
Q5 High Fidelity DNA polymérase Mastermix	New England Biolabs
Enzymes de restriction	New England Biolabs
T4 DNA ligase	New England Biolab
Inhibiteurs de protéases sans EDTA	Roche
PageBlue protein staining	TermoFisher
Tween 20	BioRad
BSA	Sigma Aldrich
Imidazole	Fluka
Desthiobiotine	IBA lifescience

1.7 Colonnes et matrices de purification

- La purification des protéines présentant un His-tag ont été purifiés sur des colonnes HisTrap (GE Healthcare).
- La purification de FtsBLQ présentant un Strep-tag ou TwinStrep-tag a été réalisée à l'aide d'une matrice StrepTactin (IBA lifescience).
- Le dessalage des échantillons protéiques a été réalisé sur colonne G25 (50 ml) ou PD10 (8,3 ml) (GE Healthcare), des tamis moléculaires de faible résolution.

- Les tamis moléculaires de haute résolution ont été réalisés sur la colonne Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare).

1.8 Western blot

Les Western blot nécessitent :

- Des membranes PVDF (GE Healthcare), du papier Wattman (Macherey-Nagel).
- Les tampons suivants [tampon de transfert : 192 mM glycine, 25 mM Tris-HCl pH 8, 20 % méthanol ; tampon de blocage : TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,6), 3 % (w/v) BSA, 0,5 % (v/v) Tween 20 ; tampon de lavage : TBS 0,1 % (v/v) Tween 20 ; tampon de dilution des anticorps : TBS, 0,1% (v/v) Tween 20, 1% (w/v)].
- Les anticorps :
 - Les anticorps polyclonaux (lapin) dirigés contre FtsB et FtsL (un don de J. Luirik, Université d'Amsterdam).
 - Les anticorps anti-His-tag (souris) couplés à la HRP (horseradish peroxidase) (Roche).
 - Les anticorps monoclonaux anti-FtsQ (souris) (sélectionnés par Nienke Buddelmeijer).
 - Les anticorps de haute affinité anti-épitope HA (Hémagglutinine) (souris) (Roche).
 - Les anticorps secondaires IgG de mouton anti-lapin ou de chèvre anti-souris couplés à la HRP (Millipore).
- Le Kit ECL (Clarity and Clarity Max ECL Western Blotting Substrates - GE Healthcare).

1.9 Peptides

Deux peptides synthétiques ont été utilisés : le peptide, issu de FtsN (K69-Q93) couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC-KVTGNGLPPKPEERWRYIKELESRQ) et un autre peptide issu de FtsN (L75-Q93 : LPPKPEERWRYIKELESRQ) (Synpeptide co).

1.10 Appareillages, kits et consommables

- L'ensemble des essais de cristallogénèse ont été réalisés avec les kits MemStart, MemPlus, MemGold et MemGold 2 (Molecular Dimensions) et avec l'aide du robot Mosquito (TTP LabTech).
- Le Typhoon Trio+ Imager (GE Healthcare) a été utilisé pour révéler des échantillons marqués (PBPs, Lipide II ou peptidoglycane), fluorescents ou radioactifs, sur un support tel qu'un gel SDS-PAGE, une TLC, ou autres supports solides.
- Le spectrophotomètre Nanovue (GE Healthcare) a été utilisé pour la quantification de l'ADN.
- Les réactions de tranglycosylation avec le [¹⁴C]-Lipide II ont été déposées sur des TLC en silice (Fluka) et nécessite une cuve en verre approprié.

- Les kits de biologie moléculaire suivants : kit de mutagenèse Q5 (New England Biolabs), kit In Fusion (Takara Bio), kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) et kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel).
- Concentrateurs pour concentrer les échantillons protéiques (Amicon). Différents « *cut-off* » sont utilisés (30, 50 et 100 kDa) en fonction de la taille de la protéine ou du complexe protéique d'intérêt.
- Le kit BCA (ThermoFisher) a été utilisé pour déterminer la concentration en protéine des échantillons purifiés.
- L'appareillage Trans-Blot Turbo System (Biorad) a été utilisé pour réaliser les expériences de Western blot.
- Les images de bactéries ont été réalisées à l'aide du Microscope Zeiss Axio Imager.Z1.
- Microplaques et lecteurs de microplaques :
 - Les microplaques: black 384-well plate (Greiner Bio-One Polystyrene Non-Binding Flat Bottom), medium binding black 96-well microplate, white 96-well microplate (Greiner Bio One), UV-Star microplate 96-well half-area format (Greiner Bio One).
 - L'Infinite® F Plex (Tecan) équipé d'un filtre de polarisation avec des longueurs d'onde d'excitation à 485 nm et d'émission à 535 nm, appropriées pour le fluorophore NBD.
 - L'Infinite® 200 PRO Microplate reader (Tecan)

2 Méthodes

2.1 Cellules compétentes et transformation

L'introduction de plasmides dans les différentes souches d'*E. coli* rendues compétentes par un traitement au CaCl₂ et conservées à -80°C (Weston *et al.*, 1981). L'entrée du plasmide dans la bactérie a été réalisée par un choc thermique. En pratique, 100 µl de bactéries compétentes sont mis en contact avec environ 50 ng de plasmide purifié (ou avec un produit de ligation ou de mutagenèse). Après 15 min sur glace, les cellules ont été incubées pendant 40 secondes à 42°C puis le mélange est immédiatement refroidi sur glace durant 5 min. On ajoute ensuite 700 µl de milieu SOC et le mélange est incubé, sous agitation, pendant 1 h à 37°C. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte LB agar avec l'antibiotique de sélection adéquat puis incubées une nuit à 37°C.

2.2 Gel d'agarose

Les échantillons d'ADN (PCR, plasmide enzymatiquement digéré) ont été visualisés et purifiés sur gel d'agarose. Ces gels sont composés d'agarose à 1 % (w/v) dans du TAE (40 mM Tris- acétate pH 8, 2 mM EDTA) et de 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. L'échantillon d'ADN est supplémenté de colorant « Orange DNA Loading Dye » (ThermoFisher) et la migration se déroule à 120 V pendant environ 25 min dans une cuve remplie de TAE. Le gel est révélé grâce aux UV à l'aide du transilluminateur Vilbert Lourmat (Proxylab SPRL).

2.3 Dosage de l'ADN

Le dosage des échantillons d'ADN a été réalisé à l'aide du Nanovue (GE HealthCare) en mesurant l'absorbance de l'échantillon à 260 nm.

2.4 PCR et mutagenèse

L'amplification des gènes d'intérêts a été réalisée par PCR avec le Mastermix Q5® High-Fidelity DNA Polymerase et deux amores utilisées à 0,5 µM. Les paramètres suivants sont utilisés :

- Dénaturation initiale : 95°C pendant 2 min.
- Dénaturation : 95°C pendant 30 s.
- Hybridation : 30 s à la valeur de Tm des amores utilisées (déterminée avec logiciel Serial Cloner).
- Élongation : 72°C (30 s/kb).
- Élongation finale : 72°C pendant 5 min.

Le produit PCR est purifié avec le kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

Les différentes mutations ont été réalisées par PCR inverse avec le kit Q5 site-directed mutagenesis kit (New England Biolabs) avec des amores adéquates (**annexe 3**).

2.5 Clonage

Les insertions des fragments d'ADN d'intérêts (clonage) dans les plasmides de productions ont été réalisées par différentes approches reprises ci-après. Les oligonucléotides utilisés et la description de la réalisation des vecteurs plasmidiques sont décrits dans l'**annexe 3**.

2.5.1 Restriction et ligation

Les digestions enzymatiques ont été réalisées avec différents enzymes de restriction (New England Biolabs ou ThermoFisher) et en respectant les instructions et tampons donnés par les fournisseurs. Les enzymes sont ensuite inactivées à 80°C pendant 10 min. Le plasmide et le fragment d'ADN à insérer, amplifié avec

les sites de restrictions ajoutés aux extrémités, ont été tous les deux digérés par la même paire d'enzymes de restriction et purifiés. Après purification avec le kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) du plasmide et du fragment d'intérêt, une ligation de type « bouts collants » a été réalisée en mélangeant le plasmide et le fragment digérés avec un rapport molaire 1 : 4 respectivement (ratio déterminé avec le logiciel Ligation Calculator). La quantité adéquate de T4 ligase (New Engald Biolabs) et son tampon ont été ajoutés. Le mélange est incubé à 4°C pendant 16 h puis 4 h à 16°C. Le mélange de ligation a été ensuite utilisé pour transformer la souche d'*E. coli* Mach1. Les plasmides de quelques clones obtenus ont été purifiés et la bonne insertion du fragment d'intérêt a été vérifiée par digestion enzymatique puis par séquençage.

2.5.2 Clonage par la méthode « In-Fusion »

Cette méthode permet l'insertion d'un fragment d'ADN dans un plasmide linéarisé par digestion ou PCR inverse. Le fragment d'ADN d'intérêt est amplifié avec 15 pbs supplémentaires de part et d'autre qui sont complémentaires aux deux extrémités du plasmide linéarisé. Le kit In-Fusion permet ainsi l'insertion du fragment dans le plasmide qui se recircule. En pratique, après linéarisation du plasmide et amplification du gène d'intérêt, ceux-ci sont purifiés puis le kit In-Fusion HD Cloning (Takara Bio) contenant l'enzyme In-Fusion permet l'insertion, en 15 min à 50°C, du fragment dans le plasmide à l'endroit désiré. Le produit de réaction est alors transformé dans les cellules Mach1. Les plasmides de quelques clones sont alors purifiés. La bonne insertion du fragment d'intérêt a été vérifiée par digestion enzymatique puis par séquençage.

2.5.3 Hybridation des oligonucléotides « Oligonucleotide annealing »

La formation de fragments d'ADN double brin par hybridation de deux oligonucléotides est privilégiée pour les cours inserts. Cette approche consiste à utiliser deux oligonucléotides complémentaires à l'exception des extrémités formant des bouts collants. Les deux oligonucléotides à 2 µM ont été mélangés dans le tampon (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM) puis incubés à 100°C pendant 5 min avant d'être refroidis lentement à température ambiante. Le fragment a été ensuite inséré par ligation dans le plasmide cible digéré par les enzymes générant les bouts collants correspondant à ceux formés aux extrémités des oligonucleotides appariés en utilisant un rapport molaire 1:10 plasmide:fragment.

2.6 Purification de l'ADN plasmidique

Les clones d'*E. coli* Mach1, après transformation avec un plasmide ou un produit de ligation, ont été sélectionnés sur des boîtes gélosées contenant l'antibiotique adéquat, puis mis en culture dans 5 ml de milieu LB avec ce même antibiotique pendant 16 h. L'extraction et la purification des plasmides ont été réalisées à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel).

2.7 Production, extraction et purification des protéines et complexes protéiques

Les protéines PBP1by (M46-N844), PBP1a, LpoB, FtsW et le complexe FtsW-PBP3 ont été produits et purifiés comme précédemment décrit (Terrak *et al.*, 1999 ; Leclercq *et al.*, 2017 ; Egan *et al.*, 2014 ; Born *et al.*, 2006). Les protéines PBP1a et LpoB ont été obtenues du Dr. Vollmer Waldemar (Newcastle).

Généralement, les protéines ou complexes protéiques utilisés dans ce travail ont été produits et purifiés comme suit :

Les cellules *E. coli* C43 (DE3), ou Lemo21 (DE3) pour la production complexe FtsBLQ, ont été transformées avec les plasmides adéquats. Une préculture a été réalisée à partir d'un transformant et 5 ml de cette préculture ont servi à inoculer 500 ml de LB à 37°C avec l'antibiotique adéquat. L'induction a été réalisée, lorsque la DO₆₀₀ atteint environ 0,8 par l'ajout de 0,5 mM d'IPTG (et 100 µM de rhamnose pour la souche Lemo21 (DE3)) et pendant 3 h 30 à 30°C. Après centrifugation à 4000 x g pendant 20 min à 15°C, les cellules ont été resuspendues dans 25mM de Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl avec des inhibiteurs de protéases (Roche) et lysées par trois passages successifs dans le désintégrateur (Emulsiflex C3 Avestin). Après centrifugation à 4000 x g pendant 20 min à 4°C, le surnageant a été centrifugé à 150 000 x g pendant 1 h à 4°C afin de récupérer les membranes, sous forme de culot, qui ont été ensuite solubilisés dans 50 mM de HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) glycérol, 2 % (w/v) DDM (Inalco) contenant des inhibiteurs de protéase (Roche). La solubilisation des membranes est facilitée par l'utilisation d'un Potter avant une mise sous agitation rotative pendant 1 h à température ambiante de l'échantillon. Ce dernier a été ensuite centrifugé à 150 000 x g pendant 30 min à 4°C, le surnageant constitue l'extrait total des protéines membranaires solubilisées.

Lors d'une purification via l'His-tag : l'extrait a été chargé sur une colonne HisTrap (GE Healthcare) équilibrée avec le tampon 50 mM HEPES pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) glycérol, 0,05 % (w/v) DDM. Après un lavage avec ce tampon, un palier à 100 mM imidazole puis l'élution de la protéine d'intérêt avec un gradient linéaire de 100 à 500 mM d'imidazole a été réalisé à l'aide du tampon 50 mM HEPES pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) glycérol, 0,05 % w/v DDM, 500 mM d'imidazole.

Lors d'une purification via le Strep-tag : l'extrait a été chargé sur une colonne StrepTactin (IBA lifesciences) équilibrée avec le tampon 50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) glycérol, 0,05 % (w/v) DDM. Après lavage avec 10 volumes colonne de ce même tampon, la protéine d'intérêt a été élueée avec le tampon 50 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) glycérol, 0,05 % (w/v) DDM, 10 mM desthiobiotine.

In fine, les fractions contenant la ou les protéines d'intérêt ont été rassemblées et dessalées sur une colonne G25 ou PD-10 (GE Healthcare). La protéine ou le complexe protéique a été ensuite concentré sur un concentrateur de 30 ou 50 kDa de « cut-off » (Amicon) jusqu'à ~ 0,5-1 mg/ml et conservée à -20°C dans les tampons suivants : FtsW, FtsW-PBP3, FtsBLQ et autres complexes (50 mM HEPES pH 7,5, NaCl 300 mM, glycérol 10 % (v/v), 0,05% (w/v) DDM), PBP1a (HEPES 25 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, NaCl 200 mM, 10 % (v/v) glycérol, Triton X-100 0,2%, NaN₃ 0,02%) et LpoB (HEPES 25 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, glycérol 10 % (v/v)).

Particularités pour FtsN (et les mutants) et FtsN130 :

Les cellules *E. coli* C43 (DE3) transformées par le plasmide pDML2032 et ces dérivés [pET22b-*ftsN*-His (Y85W), pET22b-*ftsN*-His (W83L), pET22b-*ftsN130*-His] ont été mises en culture dans du milieu 2xYT à 37°C avec de l'ampicilline 100 µg/ml. L'induction a été réalisée, lorsque la DO₆₀₀ atteint environ 0,8, par l'ajout de 0,5 mM d'IPTG et pendant 3h à 37°C. La suite du protocole de purification est identique à celui décrit ci-avant excepté que la solubilisation des membranes est réalisée dans 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1M NaCl, 20 % (v/v) glycérol et 2 % (w/v) DDM (Inalco). L'extrait total est ensuite mélangé dans un ratio 1 : 1 avec du sulfate d'ammonium 66%. Après 16 h à 4°C, l'échantillon a été centrifugé à 13500 x g 25 min à 4°C. Le culot est resuspendu dans du Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M, 10 % (v/v) glycérol, 0,2 % (w/v) DDM avant d'être purifié comme décrit ci-avant.

Particularités pour MurJ :

Les cellules *E. coli* C43 (DE3) transformées avec le plasmide pCIP1051a sont mises en culture dans du LB à 37°C avec de l'ampicilline 100 µg/ml et l'induction est réalisée, lorsque la DO₆₀₀ atteint environ 0,8, avec 0,4 mM d'IPTG pour 4h à 30°C. La suite du protocole de purification est identique à celui décrit ci-avant. Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont rassemblées et dessalées sur une colonne G25 ou PD-10 (GE Healthcare). Le Tag polyhistidine a été ensuite clivé grâce à la protéase TEV (rapport molaire 1 : 7 protéase TEV : protéine) à 4°C durant 16 h puis 2 h à température ambiante. L'échantillon a été ensuite rechargé sur une colonne HisTrap (GE Healthcare) et la protéine d'intérêt est éluee dans la fraction non liée à la matrice d'affinité et lors du lavage de la colonne avec 20 mM imidazole. La protéine a été ensuite concentrée sur un concentrateur de 50 kDa de « cut-off » (Amicon) puis injectée sur une colonne Superdex 200 increase 10/300 GL équilibrée avec 20 mM HEPES pH 7,5, 20 mM NaCl, 0,24 % (w/v) DM.

Particularités pour PBP1b (K58-S804) :

Les cellules *E. coli* C43 (DE3) transformées avec le plasmide pET28a-ponB (K58-S804) ont été mises en culture dans du LB à 37°C auquel est additionné de la kanamycine 50 µg/ml. L'induction a été réalisée, lorsque la DO₆₀₀ atteint environ 0,8, avec 0,5 mM d'IPTG pour 3h30 à 37°C. La suite du protocole de purification est identique à celui décrit ci-avant excepté que la solubilisation des membranes est réalisée dans 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 10 % v/v glycérol 2 % (w/v) DDM (Inalco). Après purification sur HisTrap (GE Healthcare) et dessalage des fractions contenant la protéine d'intérêt dans le tampon 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,04 % (w/v) DDM, le Tag polyhistidine a été clivé avec 5 unités de thrombine (Novagen) par mg de protéine pendant 16 h à température ambiante. L'échantillon a été ensuite rechargé sur colonne HisTrap équilibrée avec le tampon de purification. La fraction non fixée et la fraction obtenue après lavage avec 20 mM en imidazole sont rassemblées. Cet échantillon est alors concentré sur un concentrateur de 50 kDa de « cut-off » (Amicon) puis injecté sur une colonne Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) équilibrée avec le tampon 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 4,5 mM DM (Anatrace). La protéine purifiée est finalement concentrée jusqu'à 20 mg/ml.

2.8 SDS-PAGE et Western blot

L'analyse du contenu protéique d'un échantillon a été réalisée par SDS-PAGE (10, 12 ou 15 %) suivi d'une coloration au bleu de Coomassie (PageBlue, ThermoFisher).

Le marquage des PBPs a été réalisé à l'aide d'une pénicilline fluorescente (Bocilline, ThermoFisher) comme suit. La protéine et la Bocilline (2 µM) ont été incubées pendant 30 min à 37°C avant l'analyse par SDS-PAGE. La révélation de la fluorescence a été effectuée à l'aide du Phosphor Imager Typhoon Trio+ (GE Healthcare). Ensuite, les protéines présentes sur le gel ont été également visualisées par coloration au bleu de Coomassie.

La détection spécifique d'une protéine d'intérêt a été réalisée par Western blot après transfert des protéines séparées par gel SDS-PAGE sur une membrane PVDF (GE HealthCare) préalablement incubée 1 min dans du méthanol et lavée dans le tampon de transfert (192 mM glycine, 25 mM Tris-HCl pH 8, 20% méthanol). Le transfert des protéines sur la membrane PVDF a été réalisé à l'aide du tampon de transfert, selon les recommandations du fournisseur, dans le système Trans-Blot Turbo (Biorad). Après transfert, la membrane PVDF est incubée 2 h, sous agitation et à température ambiante, dans la solution de blocage [TBS, 3 % (w/v) BSA, 0.5 % (v/v) Tween 20]. Après trois lavages de 20 min avec 15 ml de tampon de lavage [TBS, 0.1 % (v/v) Tween 20]], le premier anticorps, dilué 1000 x [(TBS, 0.1 % (v/v) Tween 20, BSA 1 % (w/v)] à la concentration de travail, a été incubé avec la membrane 1 h sous agitation et à température ambiante. Après trois lavages de 20 min avec 15 ml de tampon de lavage (TBS, 0.1 % (v/v) Tween 20), la membrane a été soit révélée avec le Kit ECL (GE Healthcare) dans le cas d'une détection avec un anticorps primaire directement couplé à la HRP soit la membrane a été incubée avec un anticorps secondaire 1 h puis lavée comme précédemment décrit avant d'être révélée par ce même kit.

2.9 Détermination de la concentration en protéine

La concentration en protéine d'un échantillon a été déterminée à l'aide du kit BCA (ThermoFisher) dans une microplaquette white 96-well (Greiner Bio One) et selon les recommandations du fournisseur.

2.10 Test d'activité GTase avec le Lipide II radioactif

Les tests d'activité GTase du PBP1b ont été réalisés en incubant le [¹⁴C]-Lipide II (0,06 µCi/nmol) avec 100 nM du PBP1by dans le tampon HEPES 50 mM pH 7,5, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0,085 % decyl-PEG, 20 % DMSO, pendant 5-8 min à 37°C. La réaction est stoppée en chauffant l'échantillon 10 min à 80°C puis les produits de réactions ont été séparés par chromatographie sur couche mince (CCM) de silice (Fluka) en utilisant le mélange isopropanol : hydroxyde d'ammonium (25 %) : H₂O (6:2:2 vol/vol/vol) comme phase mobile. Après séchage, la plaque a été mise en contact avec un écran « Storage Phosphor » (GE Healthcare) pendant 16 h. Ce dernier a été ensuite révélé par le Typhoon Trio+ imager (GE Healthcare). Les images ont été analysées et quantifiées grâce au logiciel Image Quant TL (GE Healthcare).

2.11 Test d'activité GTase en continu avec le Lipide II fluorescent

Les tests d'activité GTase en continu avec le PBP1b ou PBP1a, ont été réalisés dans des microplaques « medium binding black 96-well » (Greiner Bio One) à 30°C en utilisant le Lipide II-dansyl comme substrat. Le milieu contient 10 µM de Lipide II-dansyl, HEPES 50 mM pH 7,5, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0,085 % décylo-PEG, 20 % DMSO, et 1 unité de *N*-acétylmuramidase de *Streptomyces globisporus* (Sigma). Les protéines FtsN, LpoB, FtsBLQ, FtsBL, FtsQ et FtsW-PBP3 ont été ajoutées à la réaction afin d'évaluer leur effet sur l'activité GTase du PBP1b. Un échantillon contenant le tampon de ces protéines a été utilisé comme contrôle. Enfin, la réaction est démarrée par l'ajout du PBP1b (50-100 nM) ou PBP1a (200-300 M) et est suivie par mesure en continu de la fluorescence pendant 20-30 min en utilisant le lecteur Infinite M200 Pro (Tecan) avec des longueurs d'onde excitation et d'émission à 340 nm et 520 nm, respectivement.

2.12 Hydrolyse de S2d par le domaine transpeptidase

L'activité du domaine TPase du PBP1b ou du PBP3 a été évaluée par l'hydrolyse du thioester S2d, mimant la terminaison D-Ala-D-Ala du peptide donneur, en présence de la 4,4-dithiodipyridine (DTDP) comme précédemment décrit (Adam *et al.*, 1991 ; Kelly *et al.*, 1992). Ce test a été réalisé dans des microplaques « UV-Star 96-well half-area » (Greiner Bio One) à 37°C en présence de phosphate de potassium 50 mM pH 7, 2 mM S2d, 3,2 mM DTDP. La réaction a été initiée par l'ajout du PBP1b ou du PBP3 respectivement à 1 et 0,8 µM. La variation de l'absorbance à 330 nm, résultant de l'hydrolyse du thioester et de la réaction du thiol ainsi libéré avec le DTDP, a été mesurée avec le lecteur de microplaque Infinite M200 Pro (Tecan). Les protéines FtsN, FtsBLQ, FtsBL et FtsQ ont été ajoutées au milieu réactionnel afin d'évaluer leur effet sur l'activité TPase du PBP1b et du PBP3. Des conditions contrôles ont été réalisées sans PBP, mais en présence des protéines FtsN, FtsBLQ, FtsBL et FtsQ.

2.13 Interaction de ^EFtsN avec le PBP1b par anisotropie de fluorescence

L'interaction entre le peptide ^EFtsN et le PBP1by a été évaluée par anisotropie de fluorescence en titrant la sonde FITC-K69-Q93 avec le PBP1by. En pratique, différentes dilutions du PBP1by ont été réalisées dans son tampon de conservation et la sonde FITC-K69-Q93 a été ajoutée à 100 nM dans un volume final de 30 µl. Les mesures ont été effectuées à l'équilibre à 21°C dans une microplaque à 384 puits (« Greiner Bio-One Polystyrene Non-Binding Flat Bottom ») après environ 30 min d'incubation à température ambiante, avec le lecteur de microplaque Infinite® F Plex (Tecan) équipé d'un filtre de polarisation avec les longueurs d'onde d'excitation à 485 nm et d'émission à 535 nm. Les interactions des protéines FtsBLQ, PBP1a, PBP3 et FtsW-PBP3 avec la sonde ont été réalisées en suivant la même procédure. Les valeurs d'anisotropie de fluorescence (FA) ont été calculées comme suit : $FA = (I_{||} - G \cdot I_{\perp}) / (I_{||} + 2G \cdot I_{\perp})$, avec $I_{||}$ et I_{\perp} les intensités de fluorescence parallèles et perpendiculaires respectivement, G est un facteur de correction pour le biais de l'instrument et déterminé expérimentalement pour la sonde seule. La constante K_d (*constante de dissociation*) a été déterminée en reportant les données de FA en fonction de la concentration en protéine avec le logiciel GraphPad Prism 6.0 en utilisant l'équation $(A - A_{min}) / (A_{max} - A_{min}) = [RL] = (K_d + [R] + [L]) - [(K_d + R) + [L]]^2 - 4[R][L] / 2$, avec A , A_{min} , A_{max} étant respectivement les anisotropies mesurées, minimum et maximum. [R], [L] et [RL] sont les concentrations à l'équilibre de la protéine libre, de la sonde et du complexe protéine-sonde.

2.14 Interaction du Lipide II avec des protéines ou des antibiotiques par anisotropie de fluorescence

Les interactions entre les protéines (PBP1b, FtsW, FtsW-PBP3 et MurJ) ou les antibiotiques (vancomycine, ramoplanine, nisine, i5b,...) avec le Lipide II–NBD ont été réalisées par anisotropie de fluorescence dans des microplaques à 384 puits (Greiner Bio-One Polystyrene Non-Binding Flat Bottom) dans un volume de 30 µl. La sonde LII-NBD à 0,33 µM a été ajoutée à des dilutions successives des protéines (PBP1by / FtsW / FtsW-PBP3 /MurJ/ FtsN) dans les conditions suivantes : (PBP1by : 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 M NaCl, 0,14% (w/v) CHAPS / FtsW et FtsW-PBP3 : HEPES 50 mM pH 7,5, 0,1 M NaCl, 0,017 % (w/v) DDM, 5 % (v/v) glycérol / MurJ : HEPES 20 mM pH 7,5, 20 mM NaCl, 0,12 % (w/v) DM / FtsN : 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,017 % (w/v) DDM, 0,1 M NaCl, 10 % (v/v) glycérol). Les différentes concentrations en antibiotiques ont été préparées dans 10 mM Tris-HCl pH 7,5 et 3 % DMSO. Après 20 min à température ambiante, les valeurs de FA sont mesurées à 21°C avec le lecteur de microplaque Infinite F Plex (Tecan) équipé de filtres de polarisation avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement à 485 nm et 535 nm. Les valeurs d'anisotropie de fluorescence ont été calculées comme décrit au point 2.13. Les valeurs d'anisotropie de fluorescence (FA) en fonction de la concentration en protéine ou en antibiotique ont permis la détermination des constants K_d comme décrite au point 2.13. L'effet des protéines et antibiotiques sur la fluorescence totale de la sonde a été mesuré afin d'appliquer une éventuelle correction aux valeurs de FA comme décrit par Dandliker *et al.*, 1981 avec l'équation $Ac = [(A - Af)/(Ab - A)] \cdot (Qf/Qb)(Ab) + Af1 + [(A - Af)/(Ab - A)](Qf/Qb)$ où A est l'anisotropie observée, A_f l'anisotropie de la sonde libre, A_b l'anisotropie de la sonde dans l'état lié, Q_f l'intensité de fluorescence de la sonde libre et Q_b l'intensité de fluorescence de la sonde liée.

Dans le cadre des expériences de compétition, le Lipide II–NBD (0,33 µM) a été ajouté à une concentration fixe en protéine (~1 µM, 50–80 % de la saturation du signal de FA) dans les tampons suivant : (FtsW et FtsW-PBP3 : HEPES 50 mM pH 7,5, 0,1 M NaCl, 0,005 % (w/v) DDM, 0,2% (w/v) CHAPS, 5% (v/v) glycérol / PBP1by : 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 M NaCl, 0,14% (w/v) CHAPS / MurJ : HEPES 20 mM pH 7,5, 20 mM NaCl, 0,08% (w/v) DM, 0,2% (w/v) CHAPS). Différentes dilutions des antibiotiques et du Lipide II non marqué ont été ajoutées aux solutions « protéine-Lipide II-NBD ». Après 20 min à température ambiante, les valeurs de FA ont été mesurées à 21°C avec le lecteur de microplaque Infinite F Plex (Tecan) équipé de filtres de polarisations avec les longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement fixées à 485 nm et 535 nm. Les valeurs d'anisotropie de fluorescence ont été calculées comme mentionné au point 2.13. Les valeurs du FA (mA) en fonction de la concentration en Lipide II non marqué ou antibiotiques ont été traitées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.0 en utilisant l'équation $[RL] = [R] / [1 + Kd/[L](1 + [C]/Ki)]$ dans laquelle $[RL]$ est la concentration en complexe protéine-sonde, $[R]$ la concentration en protéine, $[L]$ la concentration en sonde, $[C]$ la concentration du composé testé, K_d la constante de dissociation protéine-sonde et K_i la constante de dissociation entre le composé et sa cible.

2.15 Pontage chimique « cross-linking »

La protéine PBP1by (10 µM) a été incubée avec le peptide FITC-^EFtsN (100 µM) et l'agent de pontage EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) dans un rapport PBP1by:EDC de 1:1000 et 1:2000, dans le tampon de la protéine (50 mM HEPES pH 7,5, 0,3 mM NaCl, 0,7% (w/v) CHAPS). Le mélange est incubé pendant 2 h à température ambiante avant de séparer les produits de la réaction par SDS-PAGE (10%). Le gel a été scanné à l'aide du Typhoon Trio+ avec des longueurs d'onde d'excitation et

d'émission respectivement fixées à 488 nm et 526 nm, respectivement. Les images ont été analysées avec le programme image Quant TL (GE Healthcare) afin de révéler la fluorescence de la sonde FITC.

2.16 Cristallographie

Complexe PBP1b (K58-S804 : ^EFtsN)

La cristallisation du complexe a été réalisée à 20 °C par la méthode de diffusion de vapeur en goutte suspendue. La goutte a été constituée de la protéine PBP1b (K58-S804) à environ 20 mg/ml dans le tampon 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,3 M NaCl, 4,5 mM DM et contient de la moénomycine A ainsi que le peptide synthétique LPPKPEERWRYIKELESRQ (ratio molaire PBP1b : moénomycine A : peptide égal à 1 : 1 : 3). Les cristaux se sont développés dans les gouttes formées de 2 µl de solution protéique/ligands et 2 µl de solution d'agents précipitants composée de 0,1 M (NH₄)₂SO₄, 0,3 M formate de sodium, 0,1 M Tris-HCl pH 7,8, 3 % (w/v) d'acides poly-γ-glutamiques de faibles poids moléculaires (PGA-LM) et 20 % (v/v) de PEG monométhyle éther 550. Les cristaux ont été mis en contact d'une solution cryoprotectrice composée de 22 % (w/v) PEG 6000 et 30 % (v/v) PEG 400 avant d'être conservés dans l'azote liquide. Les expériences de diffraction des rayons X ont été réalisées au synchrotron Soleil (Paris-Saclay) sur la ligne Proxima 1. Les données de diffraction sont indexées, intégrées et mises à l'échelle à l'aide du programme XDS (Kabsch *et al.*, 2010). L'anisotropie des données a nécessité un traitement supplémentaire avec le logiciel Staraniso (Tickle *et al.*, 2018). La structure a été résolue par remplacement moléculaire avec Phaser en utilisant la structure du PBP1b (code PDB : 3VMA) comme modèle puis l'affinement a été opéré avec BUSTER et Coot (Sung *et al.*, 2009, McCoy *et al.*, 2007, Emsley *et al.*, 2010). La structure déposée dans la PDB porte le code 6YNO. Les données statistiques du modèle sont reprises en **annexes 4**.

2.17 Complémentation de la souche EJ-801

La souche EJ801 d'*E. coli*, dépourvue du PBP1b et possédant un PBP1a thermosensible à 42°C, a été utilisée pour tester la fonctionnalité des mutants du PBP1b lors d'expériences de complémentation. Ces expériences consistent à transformer les bactéries avec les différents plasmides (pDML924 codant pour le PBP1by et ceux codants pour les formes mutantes : T140A, R141A, R397A, T140A/R141A, T140A/R397A et R141A/R397A) et à analyser la croissance des transformants à 42°C. Les cellules ont été mises en préculture dans du LB à 30 °C additionnés de 50 µg/ml de kanamycine. La préculture a été utilisée pour inoculer 30 ml de milieu LB ou LB_{0,5} de manière à débuter la culture à une DO₆₀₀ de 0,04 à 30 °C jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ d'environ 0,15. Les cultures ont été ensuite placées à 42°C pendant 4 h avec un suivi de la DO₆₀₀ toutes les heures.

2.18 Microscopie

Les cellules EJ-801 issues des expériences de complémentation avec le pDML924 et ses différents variants portant le gène muté, ont été fixées après 1 h de culture à 42°C. La fixation des cellules a été réalisée en prélevant 1 ml de culture auquel ont été ajoutés 84 µl d'un mélange composé de 98 % de formaldéhyde (37 %) et 2 % glutaraldéhyde (25 %). Après une incubation de 15 min à température ambiante, les cellules ont été centrifugées 5 min à 3500 x g puis ont été lavées avec 1 ml de PBS avant d'être reprises dans 100

μl de PBS. Les photos des cellules fixées ont été prises en contraste de phase avec AxioCam MRm (Zeiss) monté sur le microscope Zeiss Axio Imager.Z1 en utilisant le logiciel AxioVision Rel. 4.5 (Zeiss). Les dimensions des cellules ont été mesurées avec le plugin ObjectJ (<https://sils.fnwi.uva.nl/bcb/objectj/>) ajouté au logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

2.19 Réalisation du modèle PBP1b- composé 2

Le modèle d'interaction entre le PBP1b et le composé 2 a été construit en se basant sur la structure du PBP1a de *A. aeolicus* lié au CHAPS, structurellement proche du composé 2, en utilisant le logiciel software Coot (Yuan *et al.*, 2007 ; Rmdlry *et al.*, 2010). Une procédure de minimisation énergique a alors été effectuée via le logiciel Yasara en utilisant le champ de force Yasara2 (Krieger & Vriend, 2014).

IV. Résultats et discussion

1 Chapitre 1 : synthèse du sPG et régulation

1.1 Partie 1 : interactions, organisation et régulations

Préambule :

Afin de mieux comprendre l'organisation du cœur enzymatique du divisome (protéines exposées vers le périplasme et directement impliquées dans la biosynthèse du PG septal ou sa régulation), des expériences de co-production et co-purification des protéines membranaires d'intérêts (FtsBLQ, FtsW, PBP3, PBP1b et FtsN) ont été menées. En effet, de nombreuses expériences d'interactions, notamment par des expériences de double hybride bactérien (BACTH), ont été réalisées par le passé, mais l'extraction et la purification de complexes de plus de deux protéines sont restées peu investiguées (Di Lallo *et al.*, 2003 ; Karimov *et al.*, 2005). L'intérêt de cette approche est que les complexes se forment *in vivo* puis sont extraits de la membrane, contrairement aux expériences de « pull down » où on tente de reformer les complexes *in vitro*, après extraction. Différentes combinaisons, de deux à cinq protéines, ont été testées avec un tag de purification sur une protéine afin de décortiquer le réseau d'interactions s'établissant entre ces différentes protéines. Les deux vecteurs Duet compatibles (pETDuet-1 et pRSFDuet) ont été utilisés dans ces expériences de co-expression des formes membranaires des protéines d'intérêts. Ce travail s'est centré principalement sur les PG synthases FtsW-PBP3 et PBP1b et leurs potentiels régulateurs, le complexe FtsBLQ et la protéine FtsN, qui semblent, *in vivo*, collaborer dans la régulation de la biosynthèse du sPG (Liu *et al.*, 2015 ; Tsang & Bernhardt, 2015).

Ce travail a été publié dans mBio et se retrouve à la fin de ce manuscrit :

Boes A, Olatunji S, Breukink E, Terrak M. Regulation of the Peptidoglycan Polymerase Activity of PBP1b by Antagonist Actions of the Core Divisome Proteins FtsBLQ and FtsN. *mBio*. 2019; 10(1):e01912-18.

1.1.1 Résultats

1.1.1.1 Production et purification du complexe FtsBLQ

Les protocoles de purification des protéines PBP1b, FtsW et/ou PBP3 et FtsN étant déjà bien établis au laboratoire (Terrak *et al.*, 1999 ; Leclercq *et al.*, 2017), nous avons donc mis au point la purification du complexe FtsBLQ et de ces sous-unités sous leur forme membranaire. Afin de produire le complexe FtsBLQ, et en anticipant les expériences de co-expression ultérieures, nous avons opté pour la production de ce complexe sous forme d'un transcrit polycistronique. En effet, les trois gènes ont été clonés dans le MCSI du pRSFDuet selon l'organisation suivante : T7 promoteur-*LacO-RBS-His₆-ftsB-STOP-ftsL-STOP-ftsQ-STOP*. Ainsi, les trois protéines sont exprimées à partir du même transcrit avec un tag polyhistidine en N-terminal de la protéine FtsB. Après avoir testé différents systèmes de production, la production du complexe dans la souche Lemo21(DE3) (voir matériels et méthodes) s'est avérée la plus satisfaisante. La purification du complexe par chromatographie d'affinité sur une colonne d'affinité au nickel après extraction avec du DDM montre un complexe formé par les trois protéines avec une stœchiométrie équivalente (**Fig IV.1.A**). L'identité de chacune des protéines a été confirmée par Western blot avec des anticorps anti-His₆, anti-FtsQ, anti-FtsB et anti-FtsL (**Fig IV.1.B**). Une construction alternative, où le tag polyhistidine a été remplacé par le Strep-tag II, a été réalisée. Cependant, une très faible proportion du complexe se fixe sur la colonne StrepTactin et la pureté du complexe obtenu n'est pas supérieure (**Fig IV.1.A**). Dès lors, l'utilisation de la forme du complexe FtsBLQ portant le His-tag a été privilégiée pour la suite. Les productions des complexes de deux protéines HisFtsBL, HisFtsBQ et HisFtsLQ ont été tentées. Le complexe FtsBL a pu être produit et purifié sans contamination par FtsQ (**Fig IV.1.D**). La production des deux autres complexes s'est avérée moins convaincante. Lors de la tentative de production des protéines individuellement, seule la protéine FtsQ a pu être produite, les protéines FtsB et FtsL étant possiblement instables individuellement (**Fig IV.1.C**).

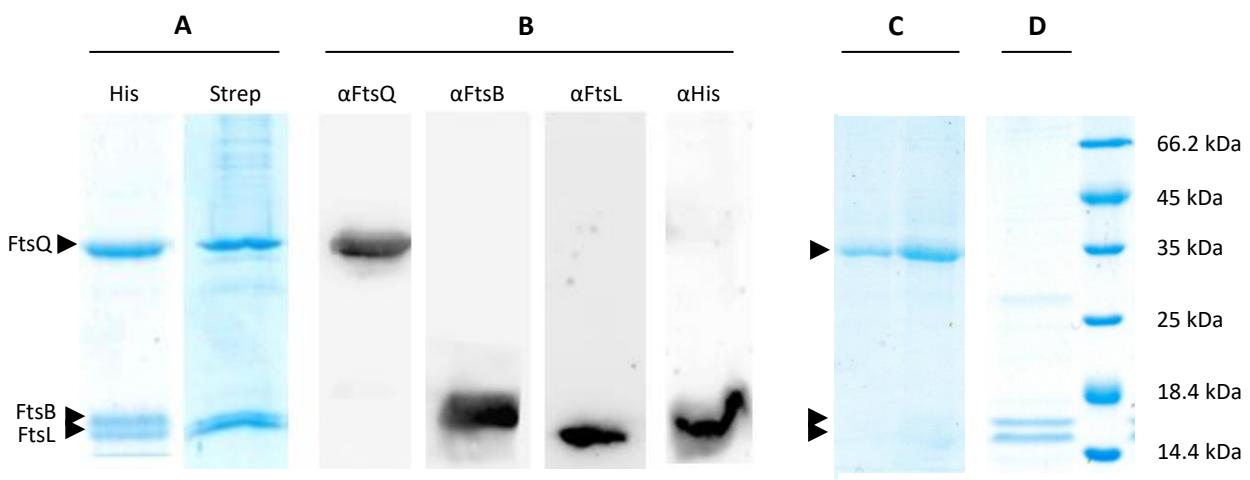


Figure IV.1 : Gel SDS-PAGE des purifications du complexe FtsBLQ, du complexe FtsBL et de la protéine FtsQ.

- Purification du complexe HisFtsBLQ par chromatographie d'affinité au nickel (à gauche) et StrepTactin (à droite).
- Western blot sur le complexe HisFtsBLQ avec respectivement, de gauche à droite, des anticorps anti-FtsQ, FtsB, FtsL et His₆.
- Purification de la protéine HisFtsQ par chromatographie d'affinité au nickel.
- Purification du complexe HisFtsBL par chromatographie d'affinité au nickel.

1.1.1.2 Évaluation des interactions

De nombreuses expériences de co-expression/co-purification ont été menées et répétées avec les protéines FtsBLQ, FtsN, FtsW, PBP3 et PBP1b. Parmi celles-ci, les expériences les plus convaincantes, où l'expression de tous les partenaires d'intérêt était satisfaisante, sont reprises dans la **Figure IV.2** et ont été menées dans les mêmes conditions. Les gels SDS-PAGE correspondants à ces expériences sont résumés sur la **Figure IV.3**. Une interaction est jugée significative à partir du moment où une (ou des protéines) d'intérêt(s) ne possédant pas de tag de purification est/sont co-éluee(s) avec la protéine d'intérêt possédant le tag de purification. Si une protéine non taguée n'est pas co-purifiée avec la protéine portant le tag de purification, alors on conclut qu'il n'y a pas d'interaction forte entre ces protéines. Il faut toutefois s'assurer que la protéine non taguée est produite et détectée dans la fraction non fixée et/ou dans les fractions de lavage. Nous avons par ailleurs vérifié que les protéines non taguées ne possédaient pas d'affinité spécifique pour la matrice de purification.

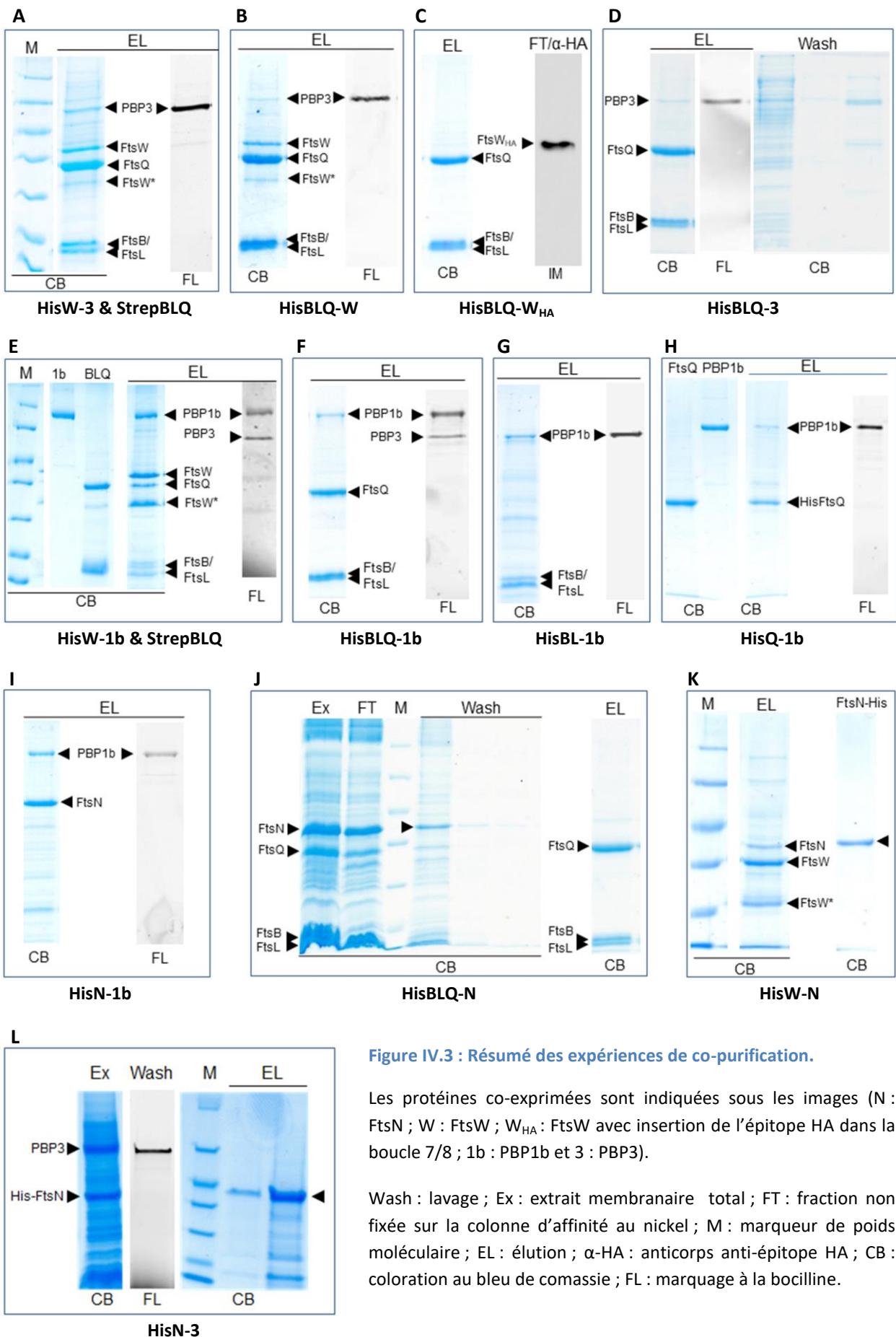
À partir de ces expériences, nous avons montré une interaction entre le complexe FtsBLQ et le complexe FtsW-PBP3 (**Fig. IV.3.A**). Cette interaction semble particulièrement dictée par l'interaction entre FtsBLQ et FtsW, l'interaction FtsBLQ-PBP3 semblant être plus labile (**Fig. IV.3.B & D**). Par ailleurs, lors de la copurification HisBLQ-FtsW, le PBP3 endogène est retrouvé dans l'élution (**Fig. IV.3.B**). Nous avons décidé d'aller plus loin dans l'analyse en utilisant la forme FtsW_{HA} présentant l'épitope Hémagglutinine (HA) au sein de la large boucle périplasmique de FtsW entre les hélices $\alpha 7/8$ (Leclercq *et al.*, 2017). Nous avons donc évalué l'interaction de cette protéine avec le complexe FtsBLQ et avons démontré l'importance de cette boucle pour l'interaction avec le complexe FtsBLQ puisque FtsW n'est plus co-purifié avec FtsBLQ et est détecté avec des anticorps anti-HA dans la fraction non fixée (**Fig. IV.3.C**). L'importance de cette boucle pour l'interaction entre FtsW et PBP3 avait précédemment été montrée, également via la forme FtsW_{HA} (Leclercq *et al.*, 2017). En outre, les interactions entre les sous-unités His-FtsBL et His-FtsQ vis-à-vis de FtsW ont été évaluées, mais aucune interaction n'a pu être détectée. Cependant, FtsW n'étant pas clairement détecté dans l'extrait total, l'absence d'interaction observée est donc incertaine.

Par ailleurs, une interaction entre FtsBLQ et le PBP1b a été mise en évidence (**Fig. IV.3.F**). Les protéines FtsBL et FtsQ interagissent individuellement avec le PBP1b bien que l'interaction FtsQ/PBP1b semble moins importante comme suggéré par la stoechiométrie du complexe purifié (**Fig. IV.3.G & H**). Il est intéressant de noter que dans le cadre du complexe FtsBLQ-PBP1b, le PBP3 endogène (non surexprimé) est détecté dans les fractions d'élution, et prend donc part au complexe, alors qu'il n'est pas détecté dans le cadre des complexes FtsQ/PBP1b et du complexe FtsBL/PBP1b (**Fig. IV.3.F**). Ce résultat exclut la possibilité que la protéine PBP3 puisse jouer le rôle d'intermédiaire dans l'interaction entre FtsBLQ et PBP1b. Nous avons par la suite évalué l'interaction entre les complexes His-FtsW-PBP1b (Leclercq *et al.*, 2017) et le complexe FtsBLQ et avons co-purifié un complexe de six protéines formé par HisFtsW/PBP1b/FtsBLQ et le PBP3 endogène (**Fig. IV.3.E**).

L'interaction entre FtsBLQ et FtsN a également été testée : le résultat semble démontrer qu'il n'y a pas d'interaction forte entre FtsBLQ et la protéine FtsN puisque l'énorme majorité de FtsN se retrouve dans la fraction non fixée et qu'il n'y a pratiquement pas de protéine FtsN co-purifiée avec le complexe FtsBLQ (**Fig. IV.3.J**). Par ailleurs, nous nous sommes concentrés sur la protéine FtsN et avons démontré qu'elle interagit très bien avec le PBP1b (**Fig. IV.3.I**), comme précédemment montré (Muller *et al.*, 2007), mais également avec FtsW (**Fig. IV.3.K**). Enfin, l'interaction entre FtsN et PBP3 a été évaluée : PBP3 n'est pas co-purifié avec His-FtsN signifiant qu'il n'y a pas d'interaction forte entre ces deux protéines (**Fig. IV.3.L**).

Protéines co-exprimées	Interactions observées
HisFtsW-PBP3/StrepBLQ	Oui
HisFtsBLQ/FtsW	Oui
HisFtsBLQ/PBP3	Faible interaction
HisFtsBLQ/PBP1b	Oui + PBP3 endogène
HisFtsBLQ/FtsN	Non ou très faible interaction
HisFtsBLQ/FtsW _{HA}	Non ou très faible interaction
HisFtsBL	Oui
HisFtsBL/PBP1b	Oui
HisFtsQ/PBP1b	Oui moins forte que FtsBL/PBP1b
HisFtsW/FtsN	Oui
HisFtsN/PBP1b	Oui
HisFtsBL/FtsW	/
HisFtsQ/FtsW	/
HisFtsN/PBP3	Non ou très faible interaction
HisFtsW-PBP1b/StrepBLQ	Oui + PBP3 endogène

Figure IV.2 : Résumé des co-expressions réalisées et interactions identifiées.

**Figure IV.3 : Résumé des expériences de co-purification.**

Les protéines co-exprimées sont indiquées sous les images (N : FtsN ; W : FtsW ; W_{HA} : FtsW avec insertion de l'épitope HA dans la boucle 7/8 ; 1b : PBP1b et 3 : PBP3).

Wash : lavage ; Ex : extract membranaire total ; FT : fraction non fixée sur la colonne d'affinité au nickel ; M : marqueur de poids moléculaire ; EL : élution ; α -HA : anticorps anti-épitope HA ; CB : coloration au bleu de comassie ; FL : marquage à la bocilline.

1.1.1.3 Évaluations des activités et régulations

1.1.1.3.1 Effet de FtsBLQ et FtsN sur l'activité du PBP1b

Dans un second temps, nous avons décidé d'évaluer la signification des interactions mises en évidence, et/ou confirmées, au travers de tests d'activité *in vitro*. Les protéines FtsBLQ et FtsN interagissant avec la protéine PBP1b, nous avons voulu tester l'effet de ces protéines sur les activités GTase et TPase du PBP1b. Le test d'hydrolyse du S2d par le PBP1b permet d'évaluer l'activité du domaine TPase indépendamment de son activité GTase. En effet, l'hydrolyse de S2d par le PBP1b est accompagnée par une augmentation d'absorbance à 330 nm (Adam *et al.*, 1991). L'ajout de FtsBLQ ou FtsN n'a pas permis de modifier significativement cette activité indiquant que ces protéines n'ont pas d'effet significatif sur l'activité TPase (DD-peptidase) du PBP1b (**Fig. IV.4**).

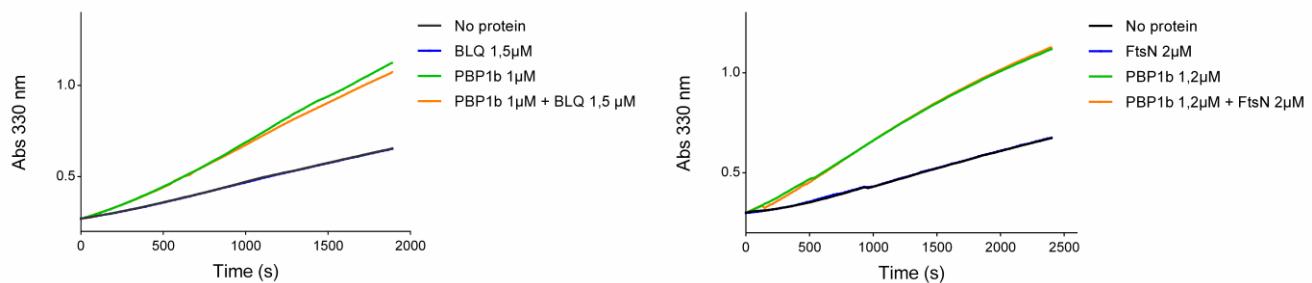


Figure IV.4 : Évaluation de l'activité TPase du PBP1b en présence de FtsBLQ et FtsN.

BLQ : FtsBLQ ; No protein : condition avec le tampon des protéines uniquement.

Ensuite, en utilisant le test d'activité GTase basé sur l'utilisation du Lipide II fluorescent (LII-dansyl) comme substrat (Schwartz *et al.*, 2002), nous avons pu mettre en évidence un effet inhibiteur de FtsBLQ sur l'activité GTase du PBP1b et ce, de manière concentration dépendante (**Fig. IV.5.A**). L'effet d'inhibition de FtsBLQ sur le PBP1b a pu être confirmé en utilisant le [¹⁴C]-Lipide II comme substrat et en analysant les produits par CCM (**Fig. IV.5.B**). Afin de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition, nous avons décidé de tester individuellement la protéine FtsQ et le complexe FtsBL sur l'activité GTase du PBP1b. Ces expériences montrent clairement que l'inhibition est réalisée par les protéines FtsBL alors que la protéine FtsQ n'a pas d'effet significatif sur l'inhibition de l'activité GTase du PBP1b (**Fig. IV.5.C & D**).

Ensuite, nous avons évalué l'effet de FtsN et de LpoB, deux activateurs du PBP1b, sur l'inhibition du PBP1b ou du complexe FtsW-PBP3-PBP1b par FtsBLQ. On observe que l'ajout de FtsN ou LpoB contrebalance l'inhibition par FtsBLQ, que ce soit avec ou sans le complexe FtsW-PBP3 (**Fig. IV.6.A-D**). En présence du complexe FtsW-PBP3, avec lequel FtsBLQ interagit notamment dans le cadre du complexe FtsBLQ-FtsW-PBP3-PBP1b, l'effet d'inhibition du complexe FtsBLQ sur l'activité GTase du PBP1b est toujours observé (**Fig. IV.6. C & D**). À noter qu'aucune activité GTase du complexe FtsW-PBP3 seul n'a pu être détectée pour ce couple de protéines malgré les nombreuses conditions utilisées (Leclercq *et al.* 2017, et résultats non publiés). Sur la base d'une étude *in vivo*, démontrant le lien génétique entre FtsBLQ et FtsN (Liu *et al.*, 2015), nous avons décidé de réaliser à la fois des mutants dans FtsB (D59H, E56K, E56A), FtsL (D93A) et dans la région essentielle de FtsN (W83L, Y85W). Les mutations dans les protéines FtsB et FtsL ont été identifiées comme permettant de complémer *in vivo* : l'absence de FtsN, la délétion de la région essentielle de FtsN (^EFtsN) ou encore notamment les mutations W83A et Y85W dans FtsN. Nous avons émis l'hypothèse que

puisque FtsN stimule l'activité du PBP1b et le complexe FtsBLQ l'inhibe, les mutants de FtsB et FtsL devraient être non-fonctionnels (incapable d'inhiber le PBP1b) afin de se passer de l'activation du PBP1b par FtsN. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons dès lors produits ces variants afin d'évaluer l'inhibition du PBP1b par le complexe FtsBLQ contenant les mutations dans FtsB ou FtsL et la stimulation de l'activité GTase (ou la levée d'inhibition de FtsBLQ sur le PBP1b) par les mutants de FtsN. Au regard de l'inhibition par le complexe FtsBLQ, les différents mutants montrent, à concentration égale, un même taux d'inhibition que le sauvage à l'exception du mutant FtsL (D93A) qui a montré une inhibition moins importante (**Fig. IV.6.E**). Concernant les deux mutants de FtsN, seul le mutant W83L montre une réduction significative de son pouvoir stimulateur sur l'activité GTase du PBP1b et n'est plus capable de lever l'inhibition de FtsBLQ à une concentration ou la forme sauvage du FtsN le peut (**Fig. IV.6.F & G**). En outre, nous avons montré que l'interaction entre FtsN (W83L) et le PBP1b était affectée par cette mutation dans FtsN. En effet, lors d'une expérience de copurification du complexe HisFtsN-PBP1b, la mutation du résidu W83 de FtsN affecte la stœchiométrie du complexe : moins de protéine PBP1b est co-purifiée avec la protéine HisFtsN (W83L). En effet le rapport FtsN/PBP1b est de 2 : 3 pour la protéine sauvage et de 1 : 4 pour le mutant (**Fig. IV.6.H**).

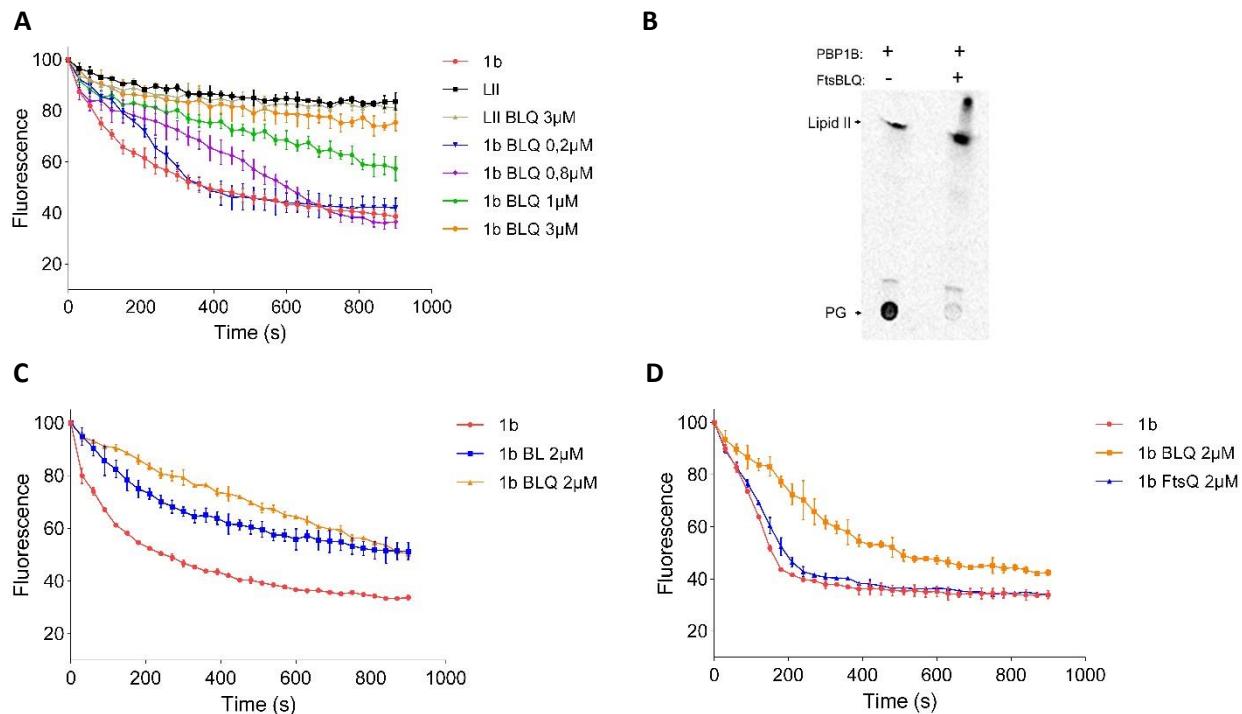


Figure IV.5 : Évaluation de l'activité GTase du PBP1b en présence de ces partenaires protéiques.

A, C et D : Suivi de l'activité GTase du PBP1b en continu avec le Lipide II-dansyl comme substrat. **B :** Analyse de la synthèse du PG à partir du [¹⁴C]-Lipide II comme substrat par le PBP1b sans et avec FtsBLQ (3 μM). PG : peptidoglycane ; 1b : PBP1b ; LII : Lipide II ; BLQ : FtsBLQ ; BL : FtsBL.

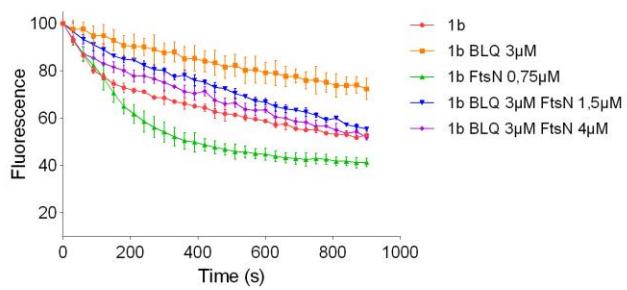
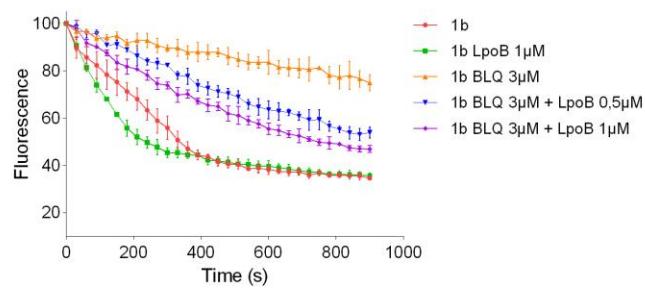
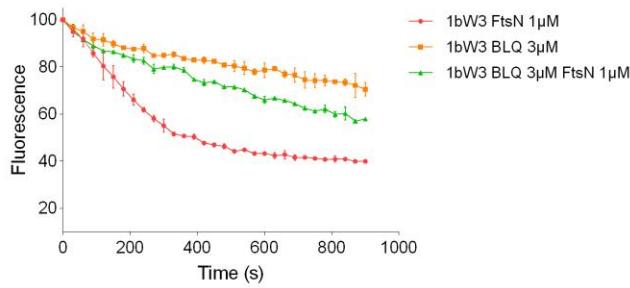
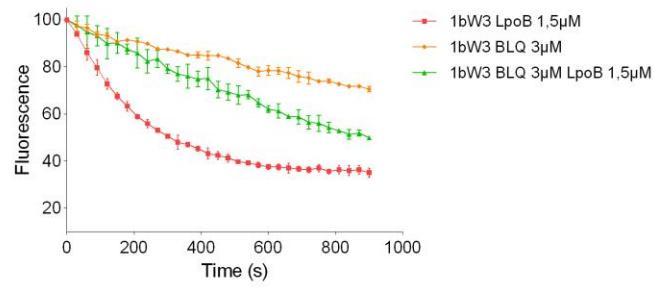
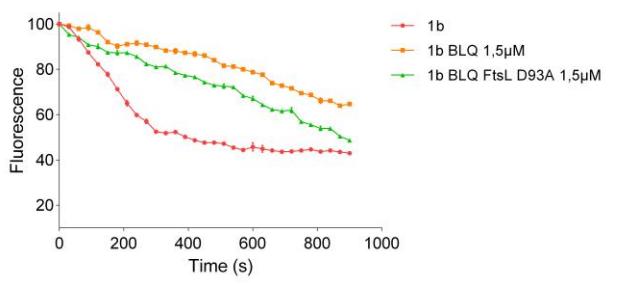
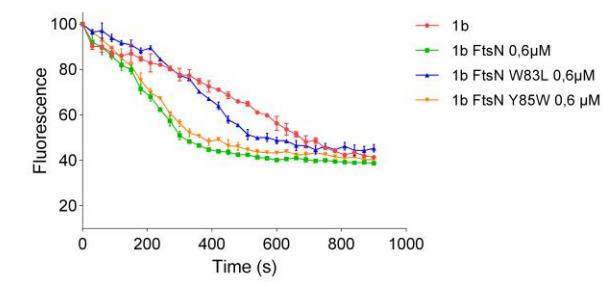
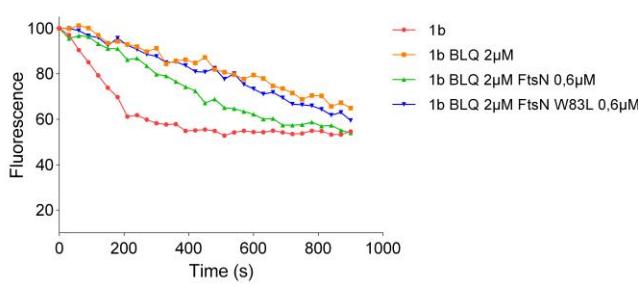
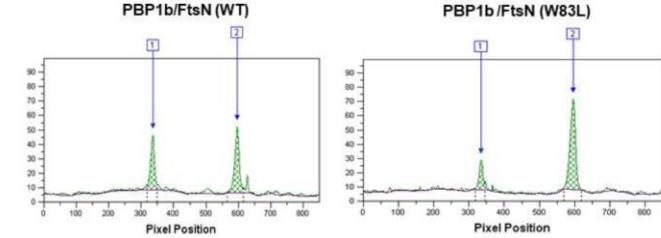
A**B****C****D****E****F****G****H**

Figure IV.6 : Évaluation de l'activité GTase du PBP1b en présence de ces partenaires protéiques et mutants.

A-G : Suivi de l'activité GTase du PBP1b en continu avec le Lipide II-dansyl comme substrat. **H.** Évaluation de la stœchiométrie, par densitométrie sur gels SDS-PAGE, des complexes HisFtsN (WT)-PBP1b et HisFtsN (W83L)-PBP1b après co-expression/co-purification sur résine d'affinité au nickel. 1b : PBP1b ; LII : Lipide II ; BLQ : FtsBLQ ; BL : FtsBLQ.

1.1.1.3.2 Effet de FtsBLQ et FtsN sur l'activité du PBP3

Le seul test d'activité disponible pour évaluer l'activité du PBP3, en plus de sa capacité de lier les β -lactamines, est celui d'hydrolyse du S2d. Nous avons pu observer l'activité de la protéine, qui se traduit par une hausse de l'absorbance à 330 nm, et son inhibition par l'aztréoname, démontrant la bonne fonctionnalité de la protéine. Nous avons ensuite testé l'effet du complexe FtsBLQ sur cette activité et avons observé une inhibition de l'activité TPase du PBP3 (Fig. IV.7.A). Afin d'identifier la sous-unité responsable de cette inhibition, nous avons testé individuellement l'effet de FtsQ et du complexe FtsBL et avons clairement observé que la protéine FtsQ était responsable de l'inhibition alors que le complexe FtsBL n'affecte pas significativement l'activité TPase du PBP3 (Fig. IV.7.B). FtsN, n'a quant à lui, pas d'effet direct significatif sur l'activité DD-peptidase du PBP3 (Fig. IV.7.C). Il n'y a d'ailleurs pas d'interaction forte entre ces deux protéines comme précédemment démontrée (Fig. IV.3.L).

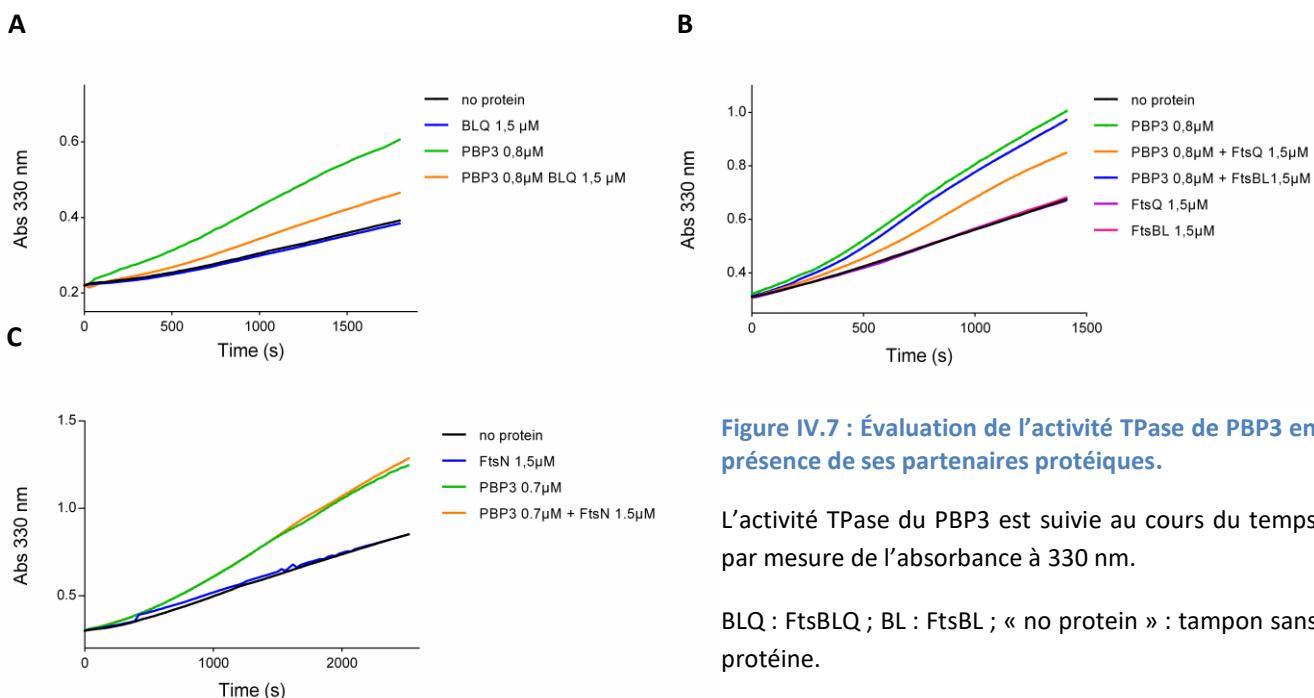


Figure IV.7 : Évaluation de l'activité TPase de PBP3 en présence de ses partenaires protéiques.

L'activité TPase du PBP3 est suivie au cours du temps par mesure de l'absorbance à 330 nm.

BLQ : FtsBLQ ; BL : FtsBL ; « no protein » : tampon sans protéine.

1.2 Partie 2 : interaction PBP1b-FtsN : nouveaux éléments biochimiques et structuraux

Préambule :

Dans la partie 2 de ce chapitre, nous nous sommes concentrés sur le mécanisme d'interaction entre les protéines PBP1b et FtsN, cette dernière étant essentielle au déclenchement de la division cellulaire, bien que son rôle exact reste mal compris. L'interaction entre ces deux protéines ainsi que l'activation du PBP1b par FtsN *in vitro*, confirmées une nouvelle fois dans le chapitre 1, sont bien établies. Par ailleurs, *in vivo*, une courte séquence au niveau de la potentielle hélice α H2, a été identifiée comme suffisante pour accomplir l'activité essentielle de FtsN lorsqu'elle est surproduite (appelée E FtsN, L75-Q93 : LPPKPEERWRYIKELESRQ) (Gerding *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2015). De plus, la mutation du résidu W83 (**en gras**) en leucine, dans la région E FtsN, réduit l'interaction avec le PBP1b et la stimulation de son activité GTase, suggérant que E FtsN est directement en interaction avec le PBP1b et que cette interaction joue un rôle important dans le déclenchement de la division d'*E. coli* (Boes *et al.*, 2019).

Ci-dessous, nous tenterons de démontrer cette hypothèse en étudiant la relation entre le peptide E FtsN et le PBP1b.

Ce travail a été publié dans *Journal of Biological Chemistry* et se retrouve à la fin de ce manuscrit :

Boes, A. *et al.* (2020) 'The bacterial cell division protein fragment E FtsN binds to and activates the major peptidoglycan synthase PBP1b', *Journal of Biological Chemistry*, p. jbc.RA120.015951.

*

1.2.1 Résultats

1.2.1.1 Interaction ${}^E\text{FtsN}$ -PBP1b

Dans un premier temps, nous avons voulu évaluer l'interaction directe entre la portion essentielle de FtsN et le PBP1b. Pour ce faire, nous avons fait synthétiser un peptide ${}^E\text{FtsN}$ couplé en N-terminal à la fluorescéine, via six résidus additionnels de la protéine (**FITC-KVTGNGLPPKPEERWRYIKELESRQ**) afin de l'utiliser comme sonde dans une expérience d'anisotropie de fluorescence avec le PBP1b. En pratique, la sonde FITC- ${}^E\text{FtsN}$ est titrée avec des quantités croissantes de PBP1b. Nous avons observé une augmentation du signal d'anisotropie de fluorescence jusqu'à saturation du signal vers 20 μM (**Fig. IV.8.C**). Ce résultat démontre l'interaction du peptide avec le PBP1b, et ce, avec une constante de dissociation de $8,46 \pm 1,79 \mu\text{M}$. Les protéines FtsBLQ, FtsW-PBP3, PBP3 et PBP1a ont été utilisées comme contrôle dans le même type d'expériences. Aucun signal significatif d'anisotropie de fluorescence n'a été mis en évidence, renforçant la spécificité de l'interaction entre le peptide ${}^E\text{FtsN}$ et le PBP1b (**Fig. IV.8.C & F**).

Nous avons ensuite décidé de réaliser des expériences de pontage entre le peptide FITC- ${}^E\text{FtsN}$ et la protéine PBP1b. Différents agents pontant ont été utilisés : le BS3 pour le pontage des lysines, le couple ADH/DMTMM pour le pontage des résidus acides et l'EDC pour le pontage résidu acide-lysine. L'EDC a la particularité d'effectuer le pontage de résidus en contact très étroit « zerolength crosslinker » : ce dernier s'est avéré le plus efficace. En effet, nous avons pu observer un produit de pontage entre le PBP1b et le peptide avec un léger décalage de taille du produit de pontage sur gel SDS-PAGE 10% (**Fig. IV.8.D**). L'analyse ultérieure du produit de pontage par spectrométrie de masse n'a malheureusement pas permis d'identifier, avec un assez haut score de fiabilité, le/les résidus impliqué(s) dans ce pontage.

Afin de mieux examiner le rôle de la région ${}^E\text{FtsN}$ dans l'activation du PBP1b, nous avons testé l'effet du peptide ${}^E\text{FtsN}$ sur l'activité GTase du PBP1b. Le résultat montre de manière remarquable que le peptide seul est suffisant pour stimuler l'activité GTase du PBP1b (**Fig. IV.8.A**). Il faut noter cependant que vu la petite taille du peptide, une concentration plus élevée (50 μM) par rapport à la protéine FtsN entière est nécessaire pour observer une stimulation du PBP1b (**Fig. IV.8.A**). Aucun effet du peptide n'est enregistré sur l'activité GTase du PBP1a, utilisé comme contrôle (**Fig. IV.8.B**). Ce résultat confirme l'observation, *in vivo*, qu'une surproduction du peptide est nécessaire pour qu'il puisse accomplir son activité et remplacer FtsN (Gerding *et al.*, 2009).

Pour mieux cerner la contribution des portions adjacentes au ${}^E\text{FtsN}$ dans la fonction de FtsN, nous avons décidé de produire et purifier une forme tronquée de FtsN correspondant à la partie N-terminale depuis le résidu M1 jusqu'au R130 (fin de l'hélice α H3 prédictive) que l'on appellera FtsN^{130} . Cette forme de FtsN est toujours capable d'activer le PBP1b, avec une efficacité légèrement inférieure par rapport à la protéine complète, mais de manière beaucoup plus efficace que le peptide ${}^E\text{FtsN}$ (**Fig. IV.8.G**). FtsN^{130} interagit toujours avec le PBP1b bien que la stœchiométrie du complexe soit affectée comparativement au complexe FtsN-PBP1b (**Fig. IV.8.E**).

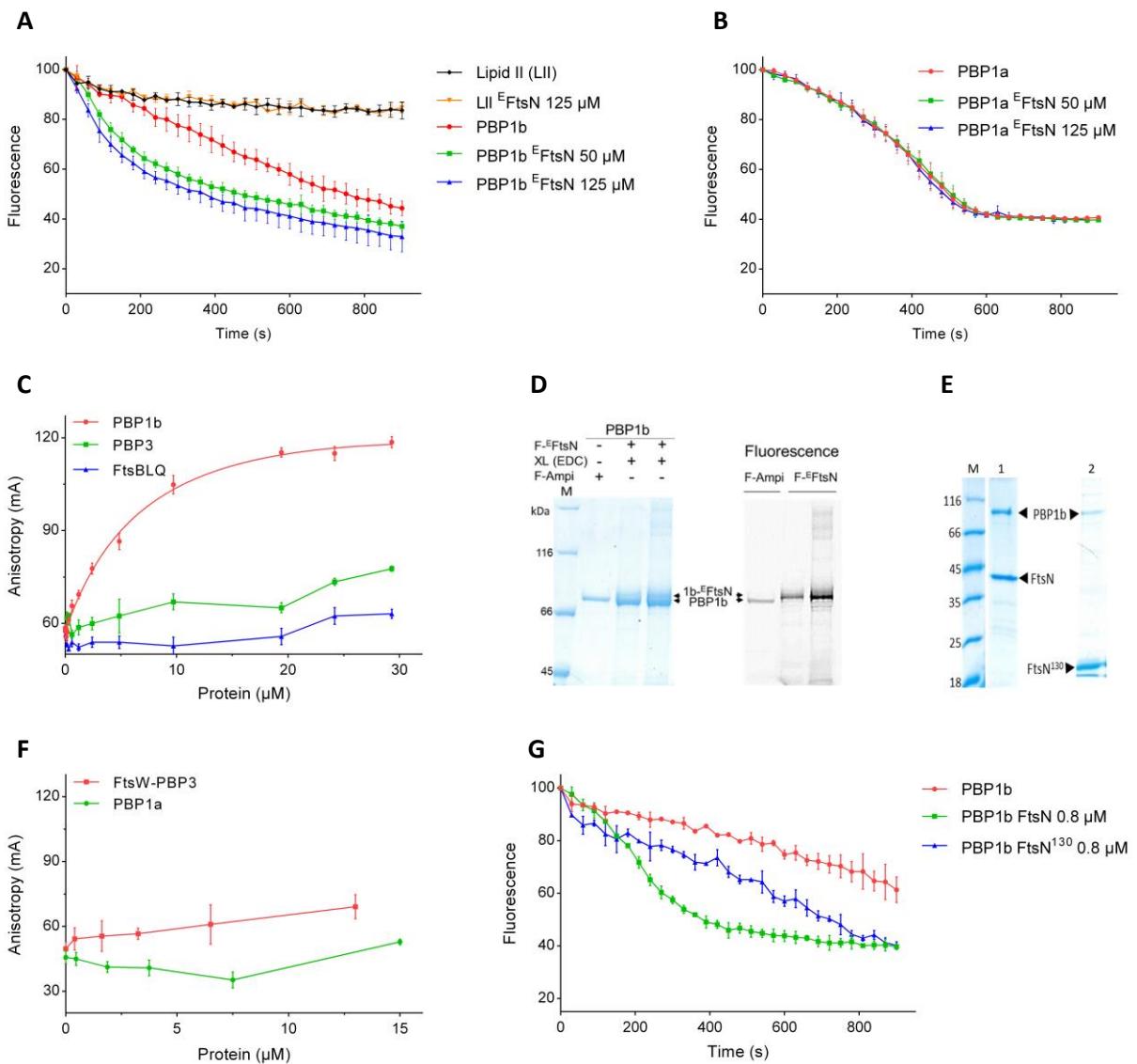


Figure IV.8 : Interaction du peptide E^{FtsN} et de FtsN^{130} avec le PBP1b et stimulation de l'activité GTase.

- Suivi de l'effet du peptide E^{FtsN} sur l'activité GTase du PBP1b avec le LII-dansyl comme substrat.
- Suivi de l'effet du peptide E^{FtsN} sur l'activité GTase du PBP1b avec le LII-dansyl comme substrat.
- Titrage du peptide FITC- E^{FtsN} par les protéines PBP1b, PBP3 et FtsBLQ en anisotropie de fluorescence montrant l'interaction du peptide avec la protéine PBP1b.
- Gel SDS-PAGE du pontage (XL) du peptide FITC- E^{FtsN} et de la protéine par l'agent EDC suivi d'une révélation de la fluorescence du peptide. Le PBP1b non ponté est également chargé sur gel SDS-PAGE et marqué à l'ampicilline fluorescente.
- Gel SDS-PAGE des co-expressions/co-purifications HisFtsN-PBP1b (1) et His FtsN^{130} -PBP1b (2).
- Titrage du peptide FITC- E^{FtsN} par le complexe FtsW-PBP3 et la protéine PBP1a.
- Suivi de l'activité GTase du PBP1b (LII-dansyl) et de sa stimulation par avec le FtsN et FtsN^{130} .

1.2.1.2 Structure du complexe PBP1b-^EFtsN

Ayant maintenant suffisamment d'arguments en faveur de l'interaction du peptide ^EFtsN avec le PBP1b, nous avons décidé d'entreprendre des expériences de co-cristallisation pour identifier avec précision le site de liaison du peptide au niveau du PBP1b. Pour ce faire, nous avons produit et purifié la forme K58-S804 du PBP1b, une forme tronquée du PBP1b permettant sa concentration et sa cristallisation (Sung *et al.*, 2009 ; King *et al.*, 2016). La protéine est purifiée en présence de DDM par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel, suivi par le clivage du tag polyhistidine à la thrombine et l'élimination du tag par un deuxième passage sur colonne de nickel. Ensuite, on procède à un remplacement du détergent DDM par le DM lors d'une étape de purification par tamis moléculaire (cette étape permet également d'éliminer d'éventuels agrégats et la thrombine). Finalement, la protéine est concentrée jusqu'à 20 mg/ml en vue de la co-cristalliser avec le peptide ^EFtsN en présence de moénomycine A (cette dernière étant nécessaire à la cristallisation). Des cristaux ont été obtenus après 48 h à température ambiante et appartiennent au groupe d'espace orthorhombique P2₁2₁2. Les expériences de diffraction des rayons X ont été réalisées au synchrotron Soleil (Paris-Saclay) sur la ligne Proxima 1 et la structure a été résolue par remplacement moléculaire à une résolution de 2.4 Å, en utilisant la structure existante du PBP1b portant le code PDB 3VMA. La solution obtenue présente une densité électronique supplémentaire entre le domaine UB2H et le domaine GTase (**Fig. IV.9.A**). Après affinement, 13 acides aminés du peptide (P79-S91) sous forme d'une hélice α ont pu être attribués à cette densité supplémentaire (**Fig. IV.9.A & B**). La structure révèle différentes interactions du peptide, principalement avec le domaine GTase, mais aussi avec le domaine UB2H du PBP1b. On observe trois ponts hydrogène : entre la chaîne latérale du W83 et la fonction carbonyle de la chaîne principale appartenant au Q384 (domaine GTase), entre le carbonyle de la chaîne principale appartenant au L89 et l'hydroxyle de la T140 (domaine UB2H), entre la chaîne latérale de la E90 et la chaîne latérale du R141 (domaine UB2H) ou la chaîne principale du L224 (domaine GTase) (**Fig. IV.9.C & D**). En outre, les résidus Y85, I86 et L89 du peptide ^EFtsN forment une zone hydrophobe à proximité des résidus L224, L334, L386, L390 et L394 appartenant au domaine GTase (**Fig. IV.9.C & D**). Il faut noter que le domaine GTase est caractérisé par une densité électronique moins bien définie. De plus, on n'observe pas de changement important de conformation suite à la liaison du peptide à la protéine bien que le domaine GT semble un peu déstabilisé comparativement aux autres structures déposées dans la PDB : cela s'exprime par un facteur de température plus élevée (125 Å² pour notre structure et 75 Å² pour la structure 5HLA) (**Fig. IV.9.B**). Il faut noter que l'obtention de cristaux nécessite la présence de la moénomycine, qui pourrait interférer avec un possible changement de conformation induit par le peptide.

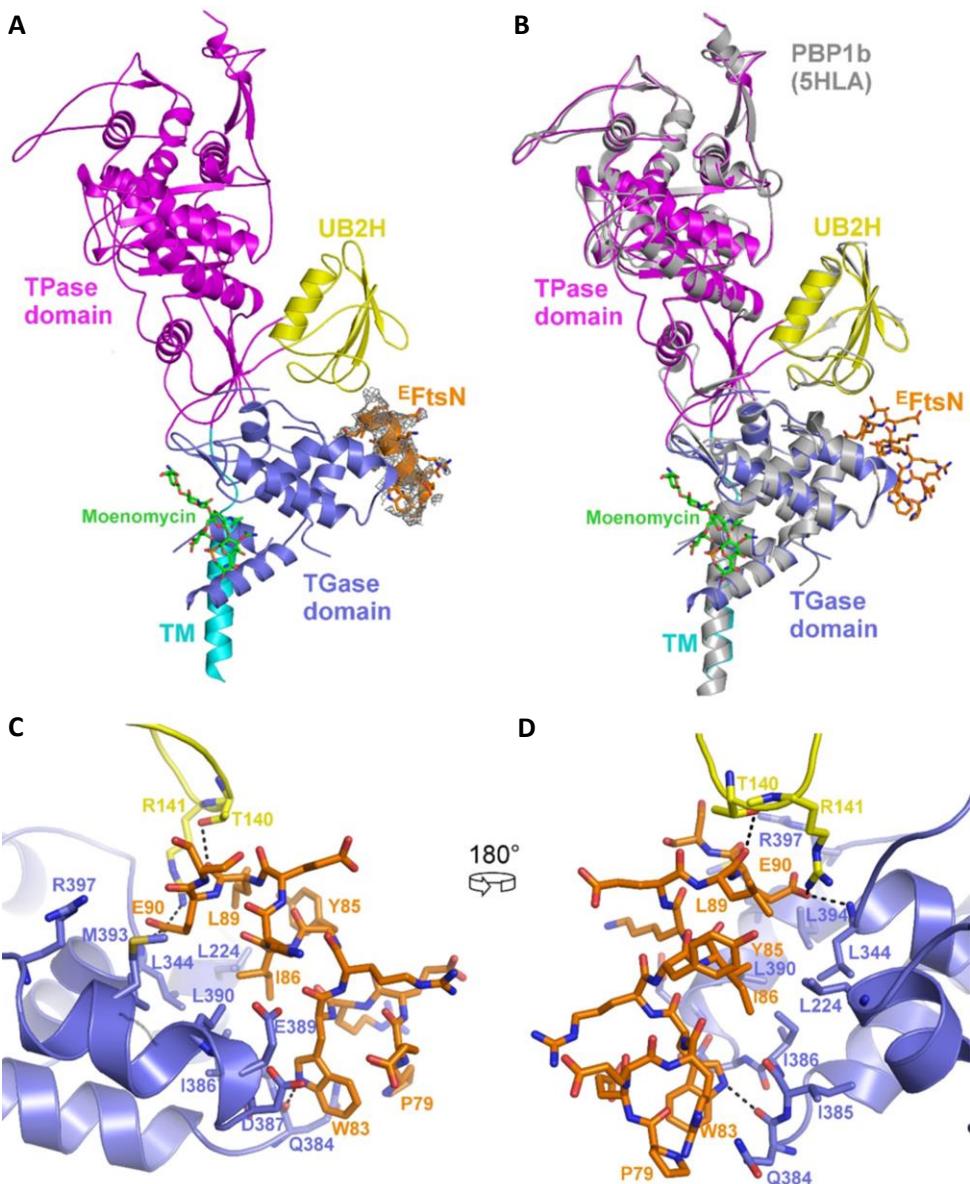


Figure IV.9 : Structure du complexe E^FtsN -PBP1b.

Structure obtenue du complexe entre E^FtsN -PBP1b-moénomycine (A) et superposition avec la structure du PBP1b avec la moénomycine en grise (5HLA) (B). Zoom sur l'interaction du peptide E^FtsN avec la protéine PBP1b (C et D).

1.2.1.3 Mutants et complémentation sur base de la structure

Sur base de la structure du complexe PBP1b- E^FtsN et afin de confirmer le lien entre E^FtsN et la division ainsi que l'importance du site de liaison de liaison de E^FtsN au PBP1b, nous avons décidé de nous concentrer sur la réalisation de mutations dans la protéine PBP1b au niveau du site de liaison du peptide E^FtsN . Nous avons choisi de muter en alanine trois résidus, dont la chaîne latérale est impliquée dans l'interaction et n'avons pas considéré les mutations de résidus dont la chaîne principale est impliquée dans l'interaction avec le peptide E^FtsN . Les résidus mutés sont : T140 et R141 du domaine UB2H interagissant avec le peptide via leur chaîne latérale respective et le résidu R397 du domaine GTase faisant partie du même groupe de résidus chargés positivement que R141, ce dernier pouvant potentiellement être en interaction, via sa chaîne latérale, avec le E90 de E^FtsN . Les simples mutants T140A, R141A et R397A ainsi que les doubles mutants

T140A/R141A, T140A/R397A et R141A/R397A ont été testés dans une expérience de complémentation avec la souche d'*E. coli* EJ-801. Cette dernière, dépourvue du PBP1b et possédant un PBP1a thermosensible à 42°C, a dès lors une croissance à 42 °C dépendant d'un aPBP fonctionnel introduit dans la souche. Ainsi, les cellules contenant les plasmides codant pour le PBP1b (pDML924) et les formes mutantes de la protéine sont mises en culture à 30°C puis 42°C et analysées. Les différents mutants complémentent pratiquement comme le sauvage à l'exception du double mutant R141A/R397A qui commence à lyser après 1 h environ et forme des cellules plus allongées à 42°C (**Fig. IV.10.A, B & D**). Nous avons donc décidé de purifier et caractériser la protéine PBP1b R141A/R397A. Dans un premier temps, nous nous sommes assurés de la thermostabilité à 42°C de cette protéine purifiée. En effet, après exposition du mutant pendant une heure à 42°C, nous avons montré que d'une part le marquage de son domaine TPase par la bocilline reste inchangé et que l'activité GTase intrinsèque de ce mutant n'est pas non plus affectée dans ces conditions (**Fig. IV.11.B & C**). Par ailleurs, l'activité du mutant R141A/R397A est sensiblement équivalente à celle de la protéine sauvage. Nous avons ensuite comparé le degré de stimulation du PBP1b mutant et la protéine non modifiée par FtsN. Les résultats montrent une diminution d'un facteur deux de la stimulation du PBP1b R141A/R397A par FtsN, comparativement à la stimulation du PBP1b sauvage (**Fig. IV.10.C**). Par contre les deux variants du PBP1b sont stimulés de manière équivalente par la protéine LpoB (**Fig. IV.11.A**).

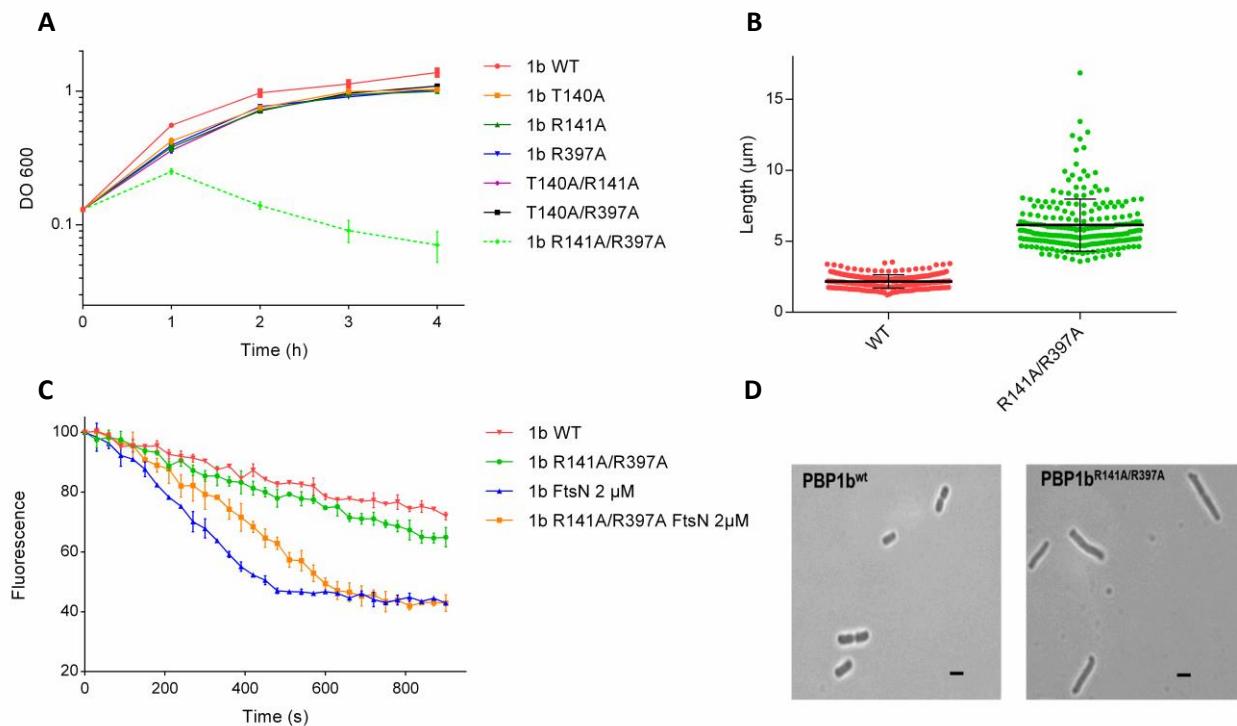


Figure IV.10 : Étude des mutants du site de liaison de FtsN au PBP1b.

- Suivi de la croissance à 42°C de la souche EJ-801 transformée avec le plasmide pDML924 permettant l'expression du PBP1b WT (1b WT) et des formes mutantes.
- Répartition des tailles des cellules EJ-801 exprimant le PBP1b WT et mutant (R141A/R397A) après 1 h de croissance à 42°C (n =250).
- Comparaison de la stimulation de l'activité GTase du PBP1b WT et du PBP1b R141A/R397A par FtsN avec le LII-dansyl comme substrat.
- Morphologie des cellules EJ-801 exprimant le PBP1b WT et mutant (R141A/R397A) après 1 h de croissance à 42°C. La barre d'échelle correspond à 2 μm.

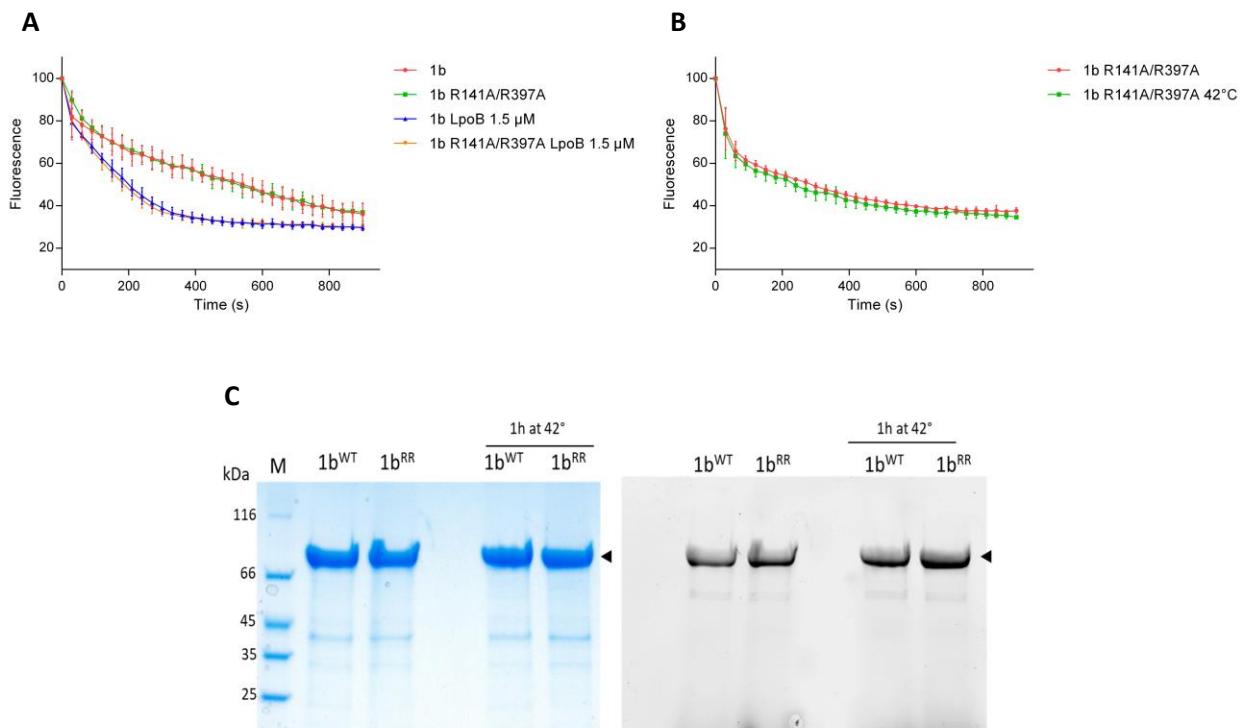


Figure IV.11 : Stabilité et stimulation par LpoB du PBP1b et de son variant R141A/R397A.

- Suivi de l'activité GTase du PBP1b et de son variant R141A/R397A en présence et absence de LpoB.
- Activité GTase intrinsèque du PBP1b R141A/R397A avant et après exposition d'une heure à 42°C.
- Gel SDS-PAGE et marquage à la bocilline du PBP1b WT et de son variant R141A/R397A (RR) avant et après exposition d'une heure à 42°C.

1.2.1.4 FtsN et PBP1b : vers un modèle plus complet

Afin d'obtenir un modèle plus complet, de multiples essais de co-cristallisation de FtsN (ou FtsN¹³⁰) avec le PBP1b (K58-S804 ou M46-S844) ont été réalisés. La forme FtsN¹³⁰ a pour avantage de ne pas contenir la région flexible riche en glutamine de FtsN, vraisemblablement défavorable à la cristallisation. Cependant, l'affinité moins forte de cette forme pour le PBP1b pourrait rendre la cristallisation du complexe plus compliquée. À ce jour, seul un cristal d'une condition de co-cristallisation entre FtsN¹³⁰ et K58-S804, en absence de moénomycine, a été obtenu et a diffracté à 4 Å. Néanmoins, aucune densité correspondante à la protéine FtsN¹³⁰ n'est observée.

1.2.2 Discussion

Dans ce chapitre, nous avons pu mettre en évidence un réseau d'interactions au sein des protéines du divisome directement impliquées dans la synthèse du sPG et sa régulation. Il en ressort que le complexe FtsBLQ et la protéine FtsN interagissent de manière indépendante avec le sous-complexe FtsW-PBP3-PBP1b (Leclercq *et al.*, 2017). FtsBLQ et FtsN interagissent tous deux avec les protéines PBP1b et FtsW alors que FtsBLQ et FtsN ne semblent pas interagir fortement de manière directe. En outre, nous avons pu montrer l'importance de la boucle périplasmique 7/8 de FtsW pour l'interaction avec FtsBLQ, ainsi qu'avec PBP3 comme ultérieurement démontrée (Leclercq *et al.*, 2017). Nous avons pu montrer que FtsBLQ exerçait une double régulation enzymatique : l'inhibition de l'activité GTase du PBP1b par FtsBL, probablement via FtsL et son résidu D93 de la région CCD «constriction control subdomain», et l'inhibition de l'activité TPase du PBP3 via FtsQ. Nous avons également montré que FtsN pouvait lever l'inhibition de FtsBLQ sur l'activité GTase du PBP1b, avec un rôle critique du résidu W83 de la zone essentielle de FtsN dans ce processus. Ce système assure une régulation de la synthèse du sPG qui se superpose probablement au système formé par les protéines LpoB/CpoB associé au système Tol-Pal, lors de la division bactérienne. Ces données sont en bonne adéquation avec de précédents résultats génétiques. En effet, des mutants suppresseurs de l'essentialité de FtsN, sélectionnés dans FtsB ou FtsL, permettent à la cellule de se diviser précocement en présence de FtsN et parviennent aussi à survivre en l'absence de FtsN (Liu *et al.*, 2015). Il avait alors été suggéré que FtsBLQ et FtsN collaboraient dans la régulation de la synthèse du sPG, FtsN déclenchant la synthèse en agissant probablement sur FtsW-PBP3 par l'intermédiaire de FtsBLQ (Liu *et al.*, 2015). Le mutant du résidu D93 de FtsL, montrant un pouvoir inhibiteur plus faible dans notre étude, avait été décrit comme un suppresseur de l'absence de FtsN ou de mutants dans la région essentielle de FtsN tel le mutant W83L. Au regard de notre modèle (**Fig. IV.12**), on explique ces résultats par le fait qu'une plus faible inactivation de l'activité de synthèse du PBP1b crée un déséquilibre pouvant être compensé par une plus faible stimulation ultérieure par FtsN. En d'autres termes, lorsque l'activité du PBP1b n'est pas inhibée par FtsBLQ, FtsN qui normalement rétablit l'activité du PBP1b, n'est plus essentiel. Par ailleurs, l'inhibition de l'activité TPase du PBP3 par FtsQ semble également en adéquation avec la littérature. En effet, chez *S. pneumoniae*, le complexe DivIB-DivIC-FtsL et en particulier DivIB (homologue du FtsQ d'*E. coli*) exerce un effet inhibiteur sur l'activité du PBP2x (bPBP homologue du PBP3 d'*E. coli*) (Noirclerc-Savoye *et al.*, 2013). En plus, *in vivo*, la mutation A255P dans FtsQ empêche le recrutement ultérieur du PBP3, suggérant une interaction entre ces protéines (Goehring *et al.*, 2007).

Bien que nous n'observons pas d'activité GTase du complexe FtsW-PBP3, malgré de nombreuses tentatives dans de diverses conditions expérimentales, la synthèse du sPG semble impliquer à la fois la contribution du PBP1b et du complexe FtsW-PBP3 collaborant probablement dans ce processus (Cho *et al.*, 2016). Le PBP1b, bien qu'exerçant un rôle en dehors de la division, se localise au site de division, interagit avec de nombreux constituants du divisome et participe à la synthèse du sPG (Egan & Vollmer, 2013 ; Gray *et al.*, 2015 ; Bertsche *et al.*, 2006 ; Müller *et al.*, 2007 ; Leclercq *et al.*, 2017 ; García del Portillo & de Pedro, 1990 ; Schmidt *et al.*, 1981 ; Vischer *et al.*, 2015 ; Banzhaf *et al.*, 2012 ; Bisicchia *et al.*, 2013). On estime que le PBP1b contribue à 50-70 % de la synthèse du sPG (Yang *et al.*, 2019). Au site de division, le nombre de molécules de PBP1b est estimé à ~18, celles de FtsBLQ à ~20-66 et celle de FtsN atteint finalement environ 150 (Vischer *et al.*, 2015 ; Bisicchia *et al.*, 2013). Il y a donc un léger excès de FtsBLQ par rapport au PBP1b et un large excès de FtsN comparativement à FtsBLQ, permettant en principe à FtsN de rentrer en compétition avec FtsBLQ pour la liaison et la régulation du PBP1b comme suggéré dans notre modèle de régulation (Boes *et al.*, 2019, den Blaauwen & Luijink 2019).

On pourrait supposer que FtsBLQ et FtsN partagent le même site de liaison. En effet, la région CCD de FtsL (soulignée ci-après), contenant le résidu D93 (**EENALGDHRSRVE**), et la région essentielle de FtsN contenant le résidu W83 (^EFtsN : LPPKPEERWRYIKELESRQ) présentent des similitudes avec un nombre équivalent de charges négatives (en gras) et deux glutamates consécutifs en amont des résidus critiques (D93 pour FtsL et W83 pour FtsN), renforce l'idée que FtsL et FtsN seraient en compétition pour le même site de liaison, possiblement chargé positivement et à proximité du domaine GTase du PBP1b. De plus, les distances des deux motifs par rapport à la membrane, et donc par rapport au domaine GTase du PBP1b sont comparables, et donc en adéquation avec ce scénario. La détermination du site de liaison de la protéine FtsL et FtsN au niveau du PBP1b permettrait de confirmer cette hypothèse.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu aller plus loin dans la compréhension de l'interaction entre les protéines PBP1b et FtsN ainsi que mieux comprendre le rôle de la région essentielle de FtsN (^EFtsN) dans l'interaction et l'activation du PBP1b. Nous avons pu mettre en évidence l'interaction directe entre la région ^EFtsN et la protéine PBP1b par anisotropie de fluorescence et par pontage chimique. Nous avons ensuite montré que ce peptide, bien qu'à concentration élevée, pouvait stimuler spécifiquement l'activité GTase du PBP1b *in vitro*. Une forme tronquée de FtsN (AA 1-130) dépourvue de la région riche en glutamine et du domaine SPOR, mais contenant la région ^EFtsN est capable de stimuler le PBP1b à un niveau moindre comparativement à la forme complète de FtsN, mais beaucoup plus efficacement par rapport au peptide isolé, montrant probablement l'importance de l'ancre membranaire dans l'interaction (Muller *et al.*, 2006 ; Pazos *et al.*, 2018).

Nous avons ensuite déterminé le site de liaison du peptide ^EFtsN à la protéine PBP1b en obtenant une structure cristallographique du complexe. La structure révèle que la région ^EFtsN se place dans un sillon entre le domaine GTase et le domaine UB2H en établissant des contacts avec ces deux domaines, mais principalement avec le domaine GTase, en accord avec la stimulation de l'activité enzymatique de ce domaine. Néanmoins, aucun changement de conformation clair n'a pu être mis en évidence. Comme cela a précédemment été mentionnée, l'utilisation de la moénomycine, indispensable à l'obtention de cristaux, pourrait empêcher le changement de conformation observé suite à la liaison du peptide. Un autre scénario serait celui dans lequel la conformation obtenue avec la moénomycine mimant le substrat soit la conformation active, favorisée également par le peptide ^EFtsN. La forte dynamique du domaine GTase et la densité moins bien définie de ce domaine pourraient également rendre un changement de conformation subtil compliqué à identifier. L'obtention d'un complexe PBP1b-FtsN¹³⁰, en absence de moénomycine, pourrait permettre d'avoir une idée plus claire sur l'interaction entre les deux protéines et les conséquences en termes de changements de conformations, si elles ont lieu.

La structure a permis d'identifier les résidus importants pour l'interaction du peptide ^EFtsN avec le PBP1b : W83, Y85, I86, L89 et E90. En particulier le résidu essentiel W83 qui est impliqué dans l'activation du PBP1b *in vitro* (Boes *et al.*, 2019). En plus, les résidus W83, Y85 et L89 sont individuellement essentiels à la fonction de FtsN *in vivo* (Liu *et al.*, 2015). Sur base de la structure PBP1b-^EFtsN obtenue, nous avons réalisé différents mutants du PBP1b dans le site d'interaction du peptide et avons analysé leur fonction *in vivo* par complémentation à 42°C. Un seul mutant (R141A/R397A) a montré une absence de complémentation et un phénotype de légère filamentation et lyse cellulaire. La protéine PBP1b R141A/R397 a dès lors été produite et purifiée. Ce variant possède une activité GTase similaire au sauvage, même après une incubation d'une heure à 42°C, indiquant que l'absence de complémentation n'est pas due à une instabilité de la protéine. Sa capacité à lier la bocilline n'est pas non plus affectée. Cependant, ce variant est moins stimulé par FtsN comparativement au PBP1b sauvage contrairement à l'activation par LpoB qui reste inchangée. Le site de liaison de ^EFtsN est différent de ceux de LpoB et CpoB, qui eux correspondent à une surface du domaine

UB2H (**Fig. IV.13**) (Egan *et al.*, 2018, 2014). Cette observation est en accord avec le fait que les stimulations de l'activité GTase du PBP1b par LpoB et de FtsN sont additives (Egan *et al.*, 2015). Dans le cas du LpoB, les données suggèrent que l'activation se fait par des changements de conformation depuis le domaine UB2H vers le domaine GTase et le domaine TPase (Egan *et al.*, 2018).

Sur base de ces résultats, en plus du fait que le PBP1b se localise au moment de la division au niveau du septum, interagit avec différentes protéines de la division, dont FtsN, et participe à environ 50-70 % de la synthèse totale du sPG (Bertsche *et al.*, 2006 ; Gray *et al.*, 2015 ; Leclercq *et al.*, 2017 ; Müller *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2019 & 2017), nous concluons que le PBP1b est une cible de la région essentielle de FtsN *in vivo* et que la stimulation de l'activité GTase du PBP1b par E FtsN contribue au déclenchement de la division d'*E. coli*. Cependant, nos expériences d'anisotropie de fluorescence n'ont pas permis d'identifier d'interactions entre E FtsN et les protéines FtsBLQ, PBP3, FtsW-PBP3, comme précédemment suggéré (Liu *et al.*, 2015). Il est possible que d'autres déterminants de la protéine FtsN entière soient importants pour l'interaction de E FtsN avec une de ces protéines précédemment citées. Également, FtsN pourrait assurer probablement d'autres fonctions, non associé à la fonctionnalité du PBP1b (Liu *et al.*, 2015 ; Weiss *et al.*, 2015).

Chez *E. coli*, la constriction dépend principalement de la synthèse du sPG et non de la dynamique de FtsZ (Coltharp *et al.*, 2016 ; Yang *et al.*, 2017). Le PBP1b joue un rôle important, en collaboration avec FtsW-PBP3, dans la synthèse du sPG (Yang *et al.*, 2019 & 2017). Le PBP1b forme deux sous-populations : une se déplaçant rapidement et une population lente, cette dernière étant catalytiquement active (Vigouroux *et al.*, 2020). Par ailleurs, FtsN présente aussi un comportement dynamique avec une localisation séparée de FtsZ (Söderström *et al.*, 2018). Dès lors, FtsN, qui lie et active le PBP1b, pourrait jouer un rôle dans la transition de la population du PBP1b en mouvement rapide vers la population lente (active) au site de division.

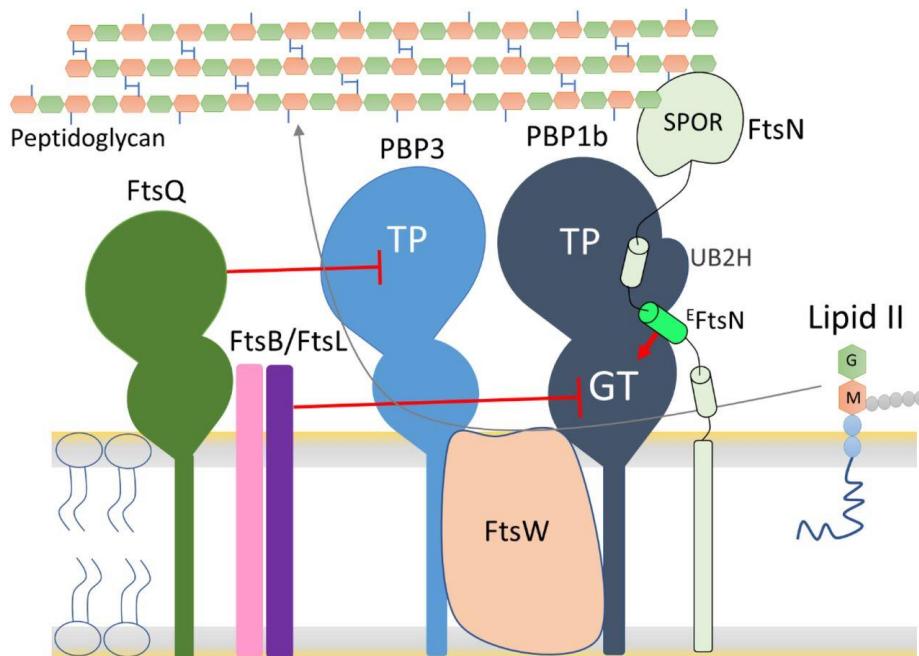


Figure IV.12 : Modèle illustrant le rôle du complexe FtsBLQ et de la région E FtsN dans la régulation de la synthèse du sPG.

Lors de l'assemblage du divisome, l'activité des PBPs est inhibée par le complexe FtsBLQ. En particulier, FtsBLQ inhibe l'activité GTase du PBP1b via FtsL et inhibe l'activité TPase de PBP3 via FtsQ. L'accumulation de FtsN et son interaction avec PBP1b mettent la région E FtsN en contact avec le domaine GTase qui active la synthèse de sPG.

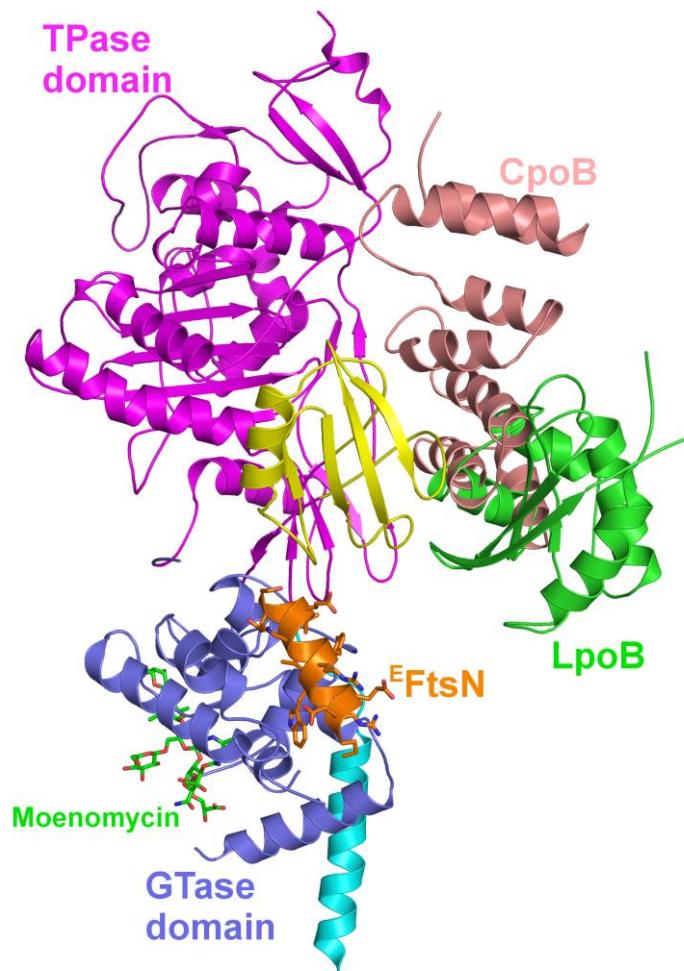


Figure IV.13 : Modèle d'un hypothétique complexe PBP1b-^EFtsN-LpoB-CpoB.

L'absence d'activité *in vitro* de FtsW ou du complexe FtsW-PBP3 d'*E. coli* empêche l'étude de la régulation de son activité. FtsW interagissant avec FtsBLQ et FtsN, il serait intéressant d'explorer une éventuelle régulation de l'activité GTase par ces protéines, en travaillant probablement avec le complexe FtsW-PBP3 d'une autre bactérie, comme celui de *P. aeruginosa* qui semble montrer une activité GTase *in vitro* (Taguchi et al., 2019).

Au regard des complexes isolés, et afin de mieux comprendre les détails des interactions et de l'organisation au sein de ces complexes, il serait intéressant de les étudier par CryoEM. Ce travail a permis d'isoler les complexes suivants qui sont de bons candidats : le complexe FtsBLQ, le complexe FtsW-PBP3 (celui de *Klebsiella pneumoniae*) ne montrant pas la dégradation observée avec la protéine d'*E. coli* (**annexe 5**), le complexe FtsBLQ-FtsW-PBP3, le complexe FtsBLQ-PBP1b et le complexe FtsN-PBP1b.

2 Chapitre 2 : Inhibition de la synthèse du PG : caractérisation d'inhibiteurs et développement d'un nouvel outil de « screening » d'inhibiteurs de la synthèse du PG

Préambule :

Afin de trouver de nouveaux antibiotiques, il est nécessaire de rechercher de nouvelles structures moléculaires visant des fonctions essentielles pour la bactérie. Pour ce faire, le développement de stratégies de découverte de telles molécules est nécessaire. La voie de synthèse du PG est une cible de choix et implique bon nombre d'enzymes pouvant être potentiellement ciblés. Le substrat Lipide II, à la base de la synthèse du PG, peut être notamment séquestré par certaines molécules telles la vancomycine ou encore la ramoplanine, bloquant ainsi les phases ultérieures. Ces dernières sont également essentielles et consistent dans le transport du Lipide II par la flippase MurJ et sa polymérisation en PG par les activités GTase et TPase des synthases, tels le PBP1b et le couple FtsW-PBP3 chez *E. coli*, particulièrement essentiels lors de la division cellulaire.

Dans ce chapitre, j'expose le développement d'un test à haut débit en polarisation de fluorescence utilisant un Lipide II fluorescent pour la découverte de molécules capables d'empêcher l'interaction du Lipide II avec une des protéines l'utilisant comme substrat (MurJ, PBP1b, FtsW et le complexe FtsW-PBP3), soit en interagissant avec le Lipide II soit en occupant le site actif de ces enzymes.

De plus, je décris la caractérisation de molécules ciblant le domaine GTase du PBP1b et confirme que le test développé permet de détecter les molécules actives contre l'activité GTase.

Ces travaux ont été publiés dans les articles suivants, retrouvés à la fin du manuscrit :

Boes A, Olatunji S, Mohammadi T, Breukink E, Terrak M. Fluorescence anisotropy assays for high throughput screening of compounds binding to lipid II, PBP1b, FtsW and MurJ. Sci Rep. 2020;10(1):6280.

Boes A, Brunel JM, Derouaux A, Kerff F, Bouhss A, Touze T, Breukink E, Terrak M. Squalamine and Aminosterol Mimics Inhibit the Peptidoglycan Glycosyltransferase Activity of PBP1b. Antibiotics (Basel). 2020 Jul 2;9(7):373.

2.1 Résultats

2.1.1 Développement d'un test à haut débit en anisotropie de fluorescence

Dans un premier temps, nous avons décidé d'évaluer l'interaction du Lipide II (LII) avec les protéines que nous avions à notre disposition (PBP1b, MurJ, FtsW et le complexe FtsW-PBP3 : voir **annexe 6**), en utilisant l'approche d'anisotropie de fluorescence avec la sonde LII-NBD. Différentes optimisations ont été réalisées afin de déterminer notamment la concentration en LII-NBD, le meilleur détergent et la meilleure concentration de celui-ci. En effet, trop de détergent ne convenait pas au test et ne donnait pas une bonne réponse en anisotropie de fluorescence. *In fine*, des conditions donnant une courbe de titrage du LII-NBD pour chaque protéine/complexe ont été trouvées (voir point **III. Matériels et méthodes**). Sur base des courbes de titrage du LII-NBD par les différentes protéines/complexe, des valeurs de Kd de l'ordre du μM ou inférieures ont pu être déterminées (**Fig. IV.14**). La protéine FtsN a été utilisée comme contrôle négatif (**annexe 7**). Il faut noter que l'effet des protéines sur la fluorescence totale de la sonde LII-NBD a été évalué et aucun effet significatif n'a été relevé. Dès lors, aucune correction des valeurs d'anisotropie n'était requise (Dandliker *et al.*, 1981). Nous avons confirmé la spécificité de la liaison de la sonde aux protéines en réalisant des expériences de compétitions par le LII non marqué (**Fig. IV.15**). Les titrages des « complexes protéines-LII-NBD » par le LII non marqué donnent tous une décroissance exponentielle de l'anisotropie de fluorescence : cela signifie que le LII non marqué prend la place de la sonde au sein de la protéine et libère donc la sonde (**Fig. IV.15**).

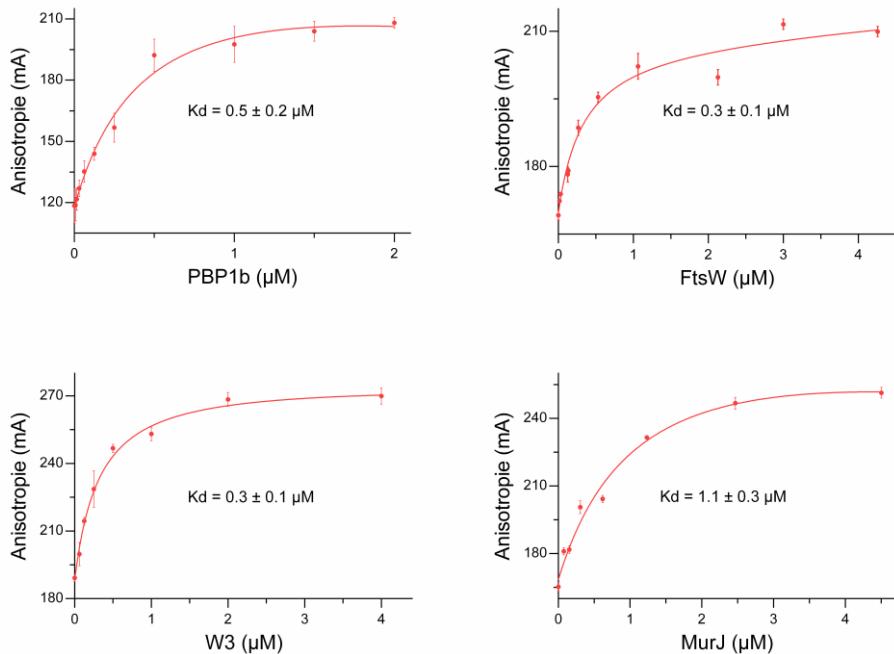


Figure IV.14 : Évaluation de liaison du LII-NBD aux protéines PBP1b, FtsW, FtsW-PBP3 (W3) et MurJ par anisotropie de fluorescence.

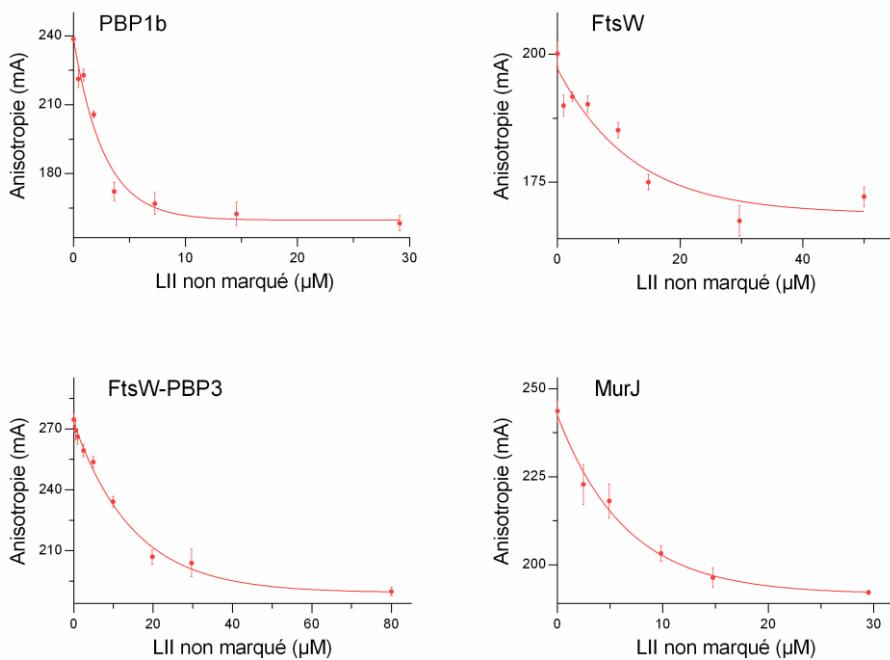


Figure IV.15 : Titrage des complexes LII-NBD-protéine par le LII non marqué et suivi de l'anisotropie de fluorescence.

Dans un second temps, nous avons voulu regarder l'influence d'antibiotiques liants le LII (ramoplanine, nisine, vancomycine, le dérivé de tryptamine appelé i5b (Derouaux *et al.*, 2011) sur la capacité qu'ont les protéines PBP1b, FtsW, FtsW-PBP3 et MurJ à lier le LII-NBD. Tout d'abord, nous avons décidé de titrer le LII-NBD par ces antibiotiques. Pour chacun de ces composés, nous avons obtenu une courbe de saturation reflétant la formation d'un complexe LII-NBD/antibiotique (Fig. IV.16.A, B, C & D). La moénomycine, ne liant pas le LII, a été utilisée comme contrôle négatif et ne donne pas de signal significatif (**annexe 7**). Le tryptophane et l'ampicilline n'ont pas d'effet non plus sur l'anisotropie de fluorescence de la sonde. L'effet des antibiotiques sur la fluorescence totale de la sonde LII-NBD a été évalué et aucun effet significatif n'a été relevé, à l'exception de la ramoplanine et du composé i5b qui réduit significativement le signal total de fluorescence de la sonde. Cet effet a nécessité une correction des valeurs brutes d'anisotropie (Dandliker *et al.*, 1981). Ensuite, nous avons titré les différents complexes « protéine-LII-NBD » par les antibiotiques. Les titrages par la ramoplanine et la nisine de ces complexes donnent tous une décroissance exponentielle de l'anisotropie de fluorescence, signifiant que la liaison de ces deux antibiotiques au LII empêche la liaison de ce dernier aux protéines PBP1b, MurJ, FtsW et FtsW-PBP3 (Fig. IV.16.E, H, K, M et **annexe 7**). La vancomycine se comporte de la même manière sur le complexe FtsW-PBP3-LII-NBD (Fig. IV.16.L). Cependant, dans le cadre des complexes PBP1b-LII-NBD et FtsW-LII-NBD, la courbe de titrage par la vancomycine montre une croissance exponentielle suggérant la formation de complexes ternaires « protéine-LII-NBD-vancomycine » (Fig. IV.16.F & I). Le titrage du complexe MurJ-LII-NBD par la vancomycine ne donne pas de réponse claire suggérant probablement, que dans nos conditions expérimentales, une fois lié à MurJ, le peptide du LII n'est plus accessible à la vancomycine (**annexe 7**). Le titrage du complexe PBP1b-LII-NBD par la moénomycine et le titrage du LII-NBD par le PBP1b en présence/absence de moénomycine reflètent l'augmentation de l'affinité du LII pour le site accepteur du domaine GTase du PBP1b lorsque la moénomycine est liée au site donneur comme précédemment décrit (Bury *et al.*, 2015) (Fig. IV.16.G & J).

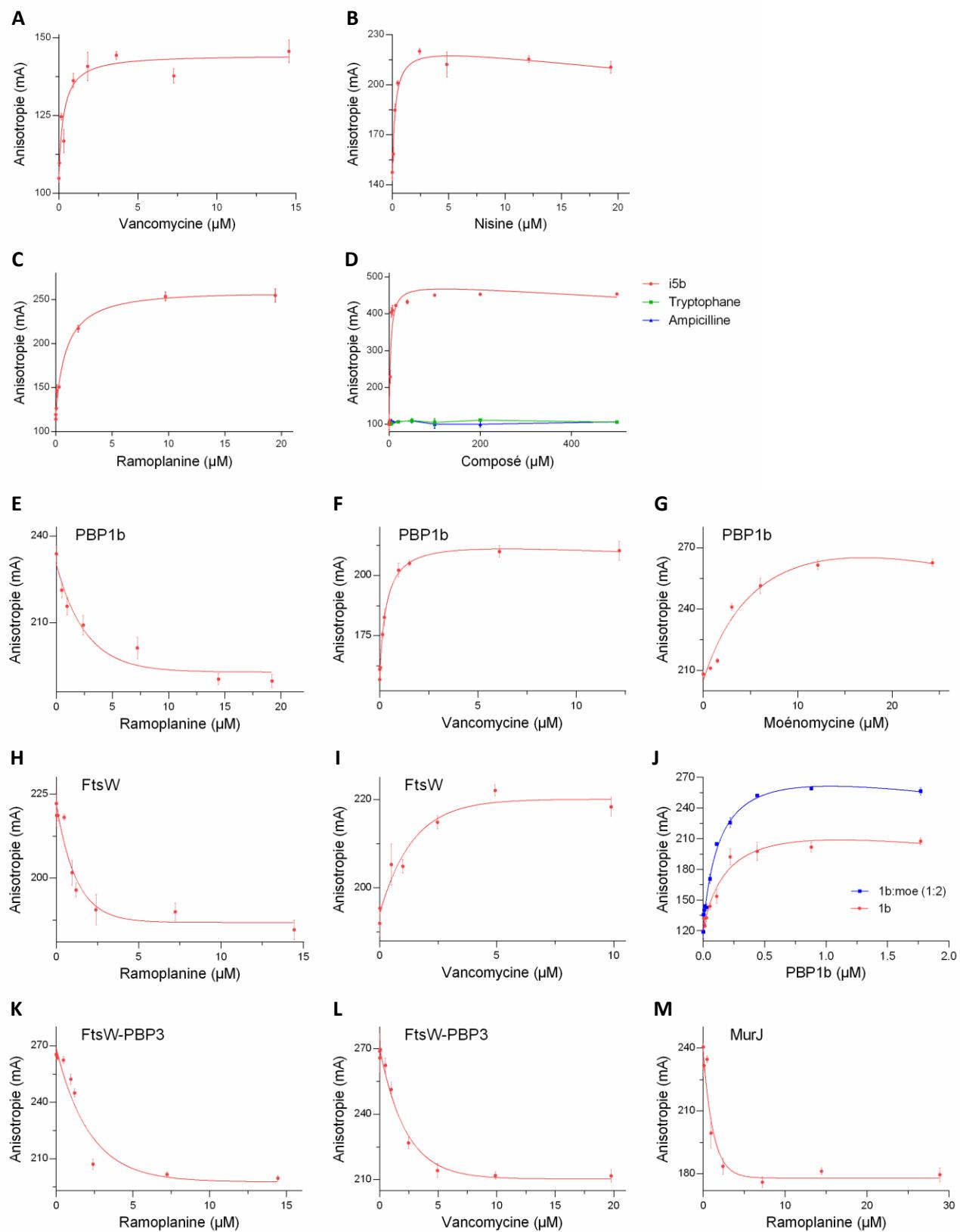


Figure IV.16 : Liaison des antibiotiques aux LII et titrage des complexes LII-protéines avec ces antibiotiques.

A, B et C. Titrage du LII-NBD par les antibiotiques (vancomycine, nisine, ramoplanine) et suivi du signal FA.

D. Le tryptophane et l'ampicilline sont utilisés comme contrôle négatif dans l'expérience de titrage du LII-NBD par le composé i5b.

J. Titrage du LII-NBD par le PBP1b et par le complexe PBP1b : moénomycine (ratio 1 : 2) et suivi du signal FA.

Par ailleurs, nous avons évalué le test développé avec un analogue de Lipide II synthétisé par le groupe du Prof. J. Van der Eycken de l'UGent (les structures de ces composés sont gardées confidentielles) parmi les plus actifs, caractérisés par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant le [¹⁴C]-LII comme substrat (**Fig. IV.17.A**). En effet, le complexe PBP1b-LII-NBD a été titré par le composé 0036 (composé le plus actif) et nous avons observé une chute de l'anisotropie de fluorescence correspondant à la compétition du composé 0036 avec le LII-NBD pour le site actif du PBP1b, comme attendu (**Fig. IV.17.B**). Cette observation renforce encore la validité du test développé au cours de ce travail.

A

Composé	IC ₅₀ (μM)
0035	65,71 ± 16,11
0029	72,70 ± 16,25
0036	52,51 ± 4,94
0067	94,58 ± 9,74
0028	408,05 ± 0,45
0031	337,47 ± 24,69
0065	175,67 ± 0,04
0193	461,26 ± 8,88
0194	316,33 ± 17,40
0064	174,37 ± 37,30
0185	415,90 ± 22,07
0188	389,01 ± 15,44
0066	101,85 ± 21,88
0068	84,85 ± 1,68
0058	101,31 ± 9,17
0186	>500
0191	>500
0192	>500
0187	>800
0165	>750
0189	>800

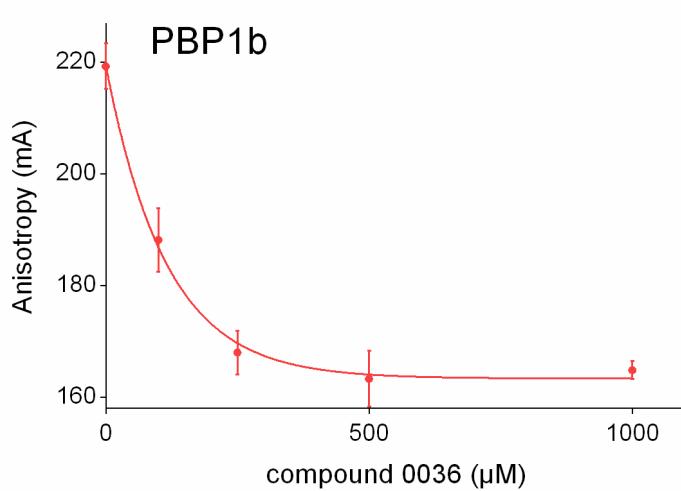
B

Figure IV.17 Caractérisation des composés analogues du Lipide II.

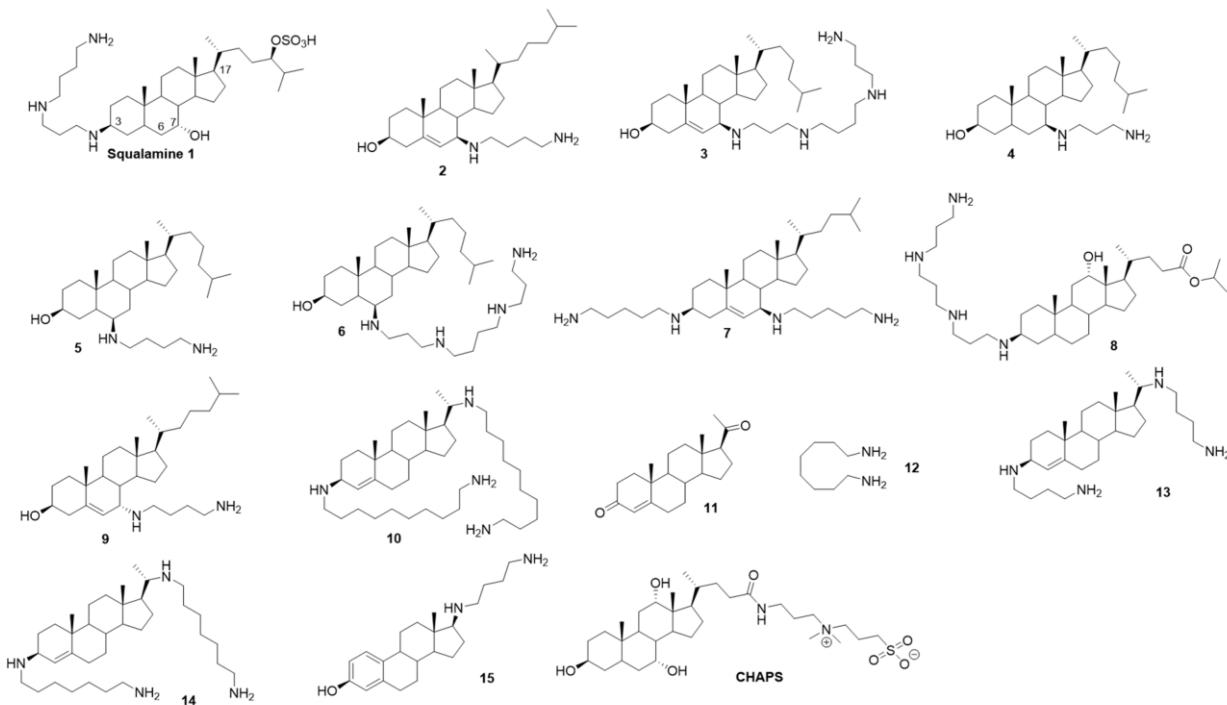
- A.** Valeurs d'IC₅₀ (activité GTase du PBP1b) des analogues de LII (synthétisés par le groupe du Prof. J Van der Eycken- UGent).
- B.** Titrage du complexe PBP1b-LII-NBD par le composé 0036 en anisotropie de fluorescence.

2.1.2 Caractérisation de la squalamine et de dérivés de type aminostéroles

Au cours de ma thèse, j'ai repris le travail débuté par le Dr. Adeline Derouaux qui avait déterminé que la squalamine, un antibiotique cationique de la famille des aminostéroles, isolé à partir du requin (Moore *et al.*, 1993 ; Douafer *et al.*, 2019), inhibait l'activité GTase du PBP1b. En plus de la squalamine, plusieurs de ces dérivés ont été synthétisés par le Dr. J-M Bruel de l'Université Aix Marseille et testés sur le PBP1b. Ces composés sont caractérisés par la présence d'une chaîne polyamine ayant un rôle dans la déstabilisation de la membrane (Moore *et al.*, 1993 ; Douafer *et al.*, 2019), et d'un noyau de stérane rappelant certains détergents comme le CHAPS. Les structures de la squalamine et des aminostéroles testés dans cette étude, ainsi que celle du CHAPS, sont reprises sur la **Figure IV.18.A**. Il faut noter qu'une structure du domaine GTase du PBP1a d'*Aquifex aeolicus*, homologue à celui du PBP1b d'*E. coli*, montre une molécule de CHAPS liant une zone hydrophobe à proximité du site actif du domaine GTase (Yuan *et al.*, 2007). Ceci suggère que la squalamine et les molécules apparentées pourraient se lier au même site.

L'effet inhibiteur de la squalamine sur l'activité GTase du PBP1b a été démontré par chromatographie sur couche mince en utilisant le [¹⁴C]-Lipide II comme substrat. Une inhibition presque totale est observée à 0,8 mM (**Fig. IV.18.B**). Ce résultat a été confirmé en utilisant le test d'activité GTase en continu utilisant le LII-dansyl comme substrat (**Fig. IV.19.A**). Cependant, aucun effet significatif du CHAPS (jusqu'à 5 mM), structurellement proche, n'a été observé sur l'activité GTase du PBP1b (**Fig. IV.19.B**). Différentes molécules de type aminostérol ont ensuite été synthétisées et caractérisées par CCM en utilisant le [¹⁴C]-Lipide II. Sur base de ces expériences, des valeurs d' IC_{50} ont pu être déterminées pour les composés les plus actifs (**Fig. IV.18.B**) comme illustrés avec le composé 6 (**Fig. IV.19.C**). Ensuite, la squalamine et un composé parmi les plus actifs (composé 6), ainsi qu'un composé non actif, ont été testés par la méthode d'anisotropie de fluorescence, développée ci-dessus, pour évaluer l'effet de ces molécules vis-à-vis de l'interaction entre le PBP1b et le LII. En effet, le complexe PBP1b-LII-NBD a été titré avec les trois composés précédemment cités : les deux composés positifs (squalamine et composé 6) induisent une diminution du signal FA et interfèrent donc avec la liaison PBP1b-LII-NBD alors que le composé 15, n'inhibant pas l'activité GTase du PBP1b, n'affecte pas l'interaction PBP1b-LII-NBD (**Fig. IV.19.D**).

Par ailleurs, le titrage du LII-NBD par ces deux composés positifs ne montre pas d'effet sur l'anisotropie de fluorescence mesuré, contrairement à ce qu'on a pu observer avec des composés liant le LII comme la ramoplanine (**Fig. IV.19.E**). Dès lors, il semblerait que les aminostéroles inhibent l'activité GTase du PBP1b en interférant avec la liaison de la protéine à son substrat LII en se liant directement à la protéine (au niveau ou à proximité du site actif) et non au LII.

A**B**

Composés	RA % (0,8 mM)	RA % (0,4 mM)	IC ₅₀ (μM)
Squalamine 1	1,1 ± 0,6	6 ± 2	291 ± 26
2	0,3 ± 0,1	1,2 ± 0,3	114 ± 6
3	8,5 ± 3,1	16 ± 2	220 ± 10
4	4,0 ± 1,0	39 ± 2	303 ± 15
5	3,0 ± 1,0	16 ± 1,4	221 ± 26
6	0,8 ± 0,4	3,9 ± 0,1	111 ± 6
7	1,5 ± 0,8	12,5 ± 4,4	229 ± 17
8	97,0 ± 0,2	/	/
9	98,0 ± 1,0	/	/
10	99,0 ± 0,5	/	/
11	96,0 ± 2,0	/	/
12	98,0 ± 1,0	/	/
13	100	/	/
14	100	/	/
15	105,0 ± 3	/	/

Figure IV.18 : Structure et caractérisation de la squalamine et de dérivés aminostéroïdes.

- A. Structures des composés utilisés dans cette étude (avec numérotation).
- B. Pourcentage d'activité GTase résiduelle du PBP1b (RA) en présence de 0,4 et 0,8 mM en composés et valeurs d'IC₅₀ déterminées pour les composés actifs.

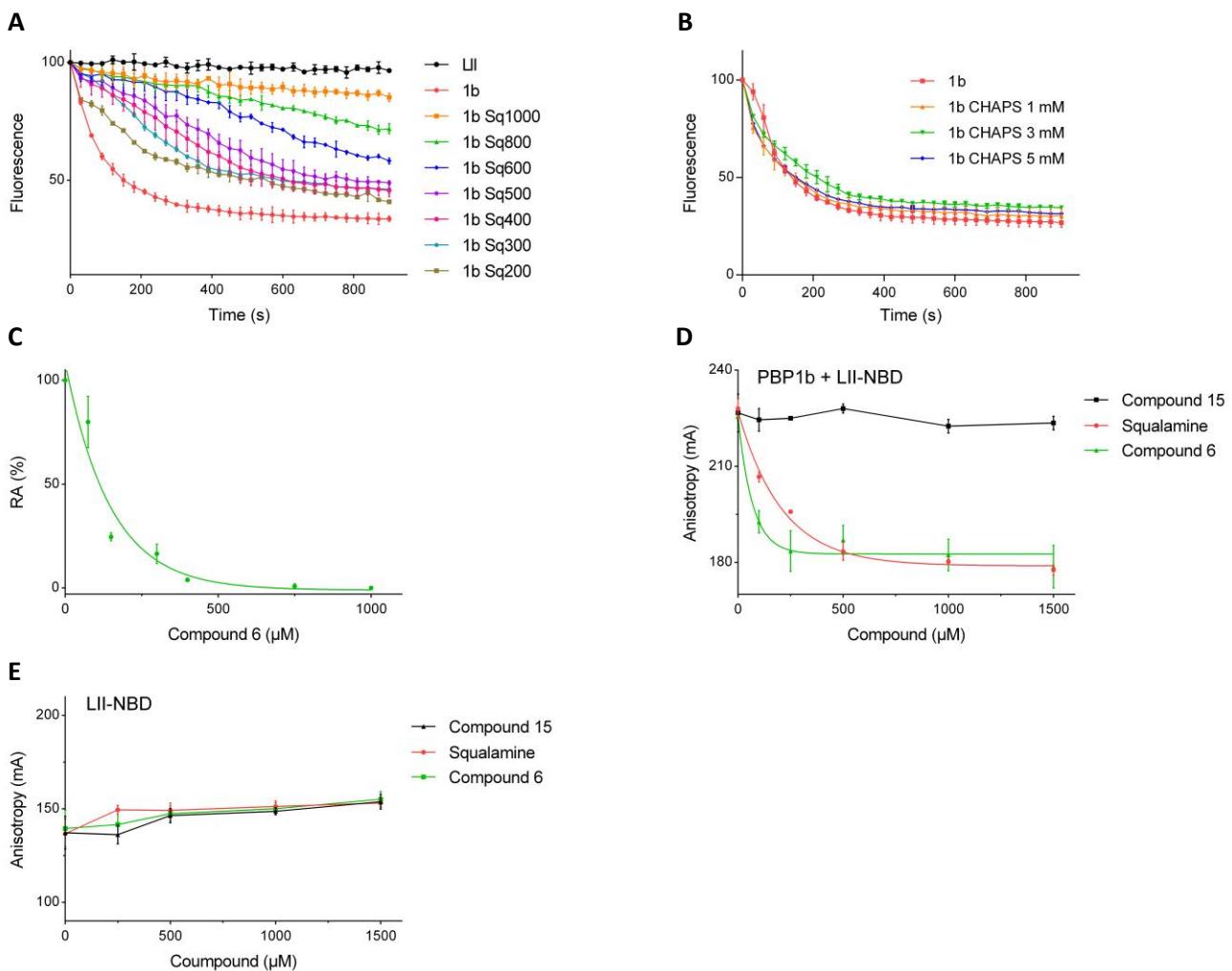


Figure IV.19 : Caractérisation de la squalamine et du composé 6.

- Suivi en continu de l'activité GTase du PBP1b avec le LII-dansyl comme substrat et des quantités croissantes de squalamine (de 200 à 1000 μ M).
- Suivi en continu de l'activité GTase du PBP1b avec le LII-dansyl comme substrat et des quantités croissantes de CHAPS (1 à 5 mM).
- Activité GTase résiduelle (RA) du PBP1b en présence du composé 6. Ces valeurs ont été déterminées par CMC avec le [14 C]-LII comme substrat.
- Titrage du complexe PBP1b-LII-NBD par la squalamine et les composés 6 et 15 en anisotropie de fluorescence montrant la compétition de la squalamine et du composé 6 pour la liaison du substrat LII-NBD.
- Titrage du LII-NBD par la squalamine et les composés 6 et 15 en anisotropie de fluorescence ne montrant aucune interaction significative de ces composés avec le LII-NBD.

Nous avons dès lors décidé de construire un modèle du complexe PBP1b : composé 2, sur base de la structure du PBP1a d'*A. aeolicus* en complexe avec le CHAPS et en appliquant une minimisation de l'énergie de liaison du composé à la protéine (**Fig. IV.20.A**). Dans le modèle construit, le composé 2 se lierait à proximité de la molécule de CHAPS (**Fig. IV.20.C**) et serait positionné de telle sorte que la chaîne hydrophile, porteuse du groupement amine terminal, pointe vers le résidu catalytique E290 du domaine GTase (**Fig. IV.20.C**). Cette configuration devrait être conservée pour les composés actifs de 3 à 7 dans lesquels la chaîne polaire se trouve approximativement à la même position du cycle stérane (carbone 6-7).

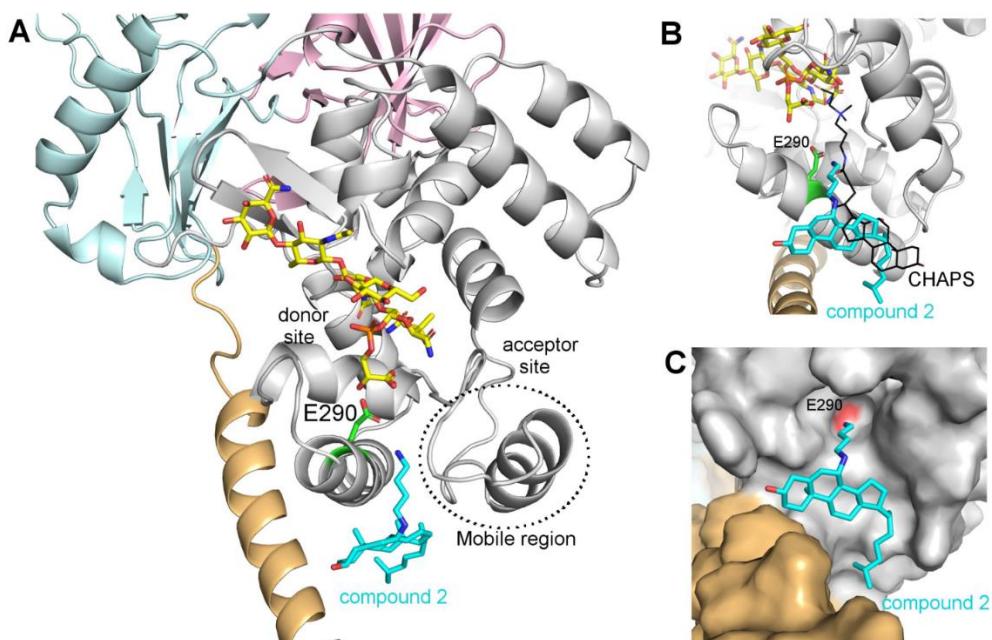


Figure IV.20 : Modèle du complexe formé entre le domaine GTase du PBP1b et le composé 2.

A et B. Vue générale du modèle de liaison du composé 2 et du CHAPS au domaine GTase du PBP1b.

C. Modèle de liaison du composé 2 au PBP1b avec la chaîne polyamine du composé pointant vers le résidu actif E290.

Des essais de co-cristallisation du PBP1b avec la squalamine et le composé 2 (dix fois plus de composés que de la protéine) ont été réalisés avec et sans moénomycine. Des cristaux ont été obtenus uniquement en présence de moénomycine et diffractent à 3,1 Å pour la squalamine et 2,7 Å pour le composé 2. Cependant, aucune densité supplémentaire correspondant à ces composés au niveau du site actif de l'enzyme n'a pu être observée.

2.2 Discussion

Développement d'un test haut débit en anisotropie de fluorescence basé sur le LII-NBD :

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons développé un test en anisotropie de fluorescence (FA) permettant de mesurer l'interaction du LII-NBD avec les protéines PBP1b, MurJ, FtsW et FtsW-PBP3. Des expériences de compétitions avec le LII non marqué constituent une preuve de l'applicabilité de ce test en vue de la détection de molécules inhibitrices ciblant le site actif de ces enzymes. De plus, le composé 0036, un analogue de LII inhibant l'activité GTase du PBP1b, a également permis de confirmer le mode d'action de ce composé et la validité du test de FA. Par ailleurs, le test développé permet de mesurer l'interaction directe entre le LII et des antibiotiques liants le LII telle que la vancomycine, la nisine, la ramoplanine et le composé I5b. En outre, ces mêmes antibiotiques peuvent être détectés de par leur interférence dans la liaison entre une protéine (PBP1b, MurJ, FtsW et FtsW-PBP3) et le LII-NBD, menant soit à une augmentation ou une diminution du signal de FA selon les cas. La nisine et la ramoplanine empêchent la liaison du LII à la protéine et engendre donc une diminution du signal de FA alors que par exemple la moénomycine engendre une augmentation du signal de FA en augmentant l'affinité du site accepteur du PBP1b pour le LII. Dès lors, lors d'un screening d'une banque de molécules sur un complexe protéine-LII-NBD, une variation significative du signal de FA induite par une molécule, doit être considérée pour une caractérisation ultérieure de cette molécule en termes d'effet sur la liaison du LII-NBD seul ou encore sur l'activité enzymatique de la protéine.

Ce test, contrairement au test basé sur la moénomycine fluorescente (Cheng *et al.*, 2008), permet de détecter de potentiels inhibiteurs de MurJ, de FtsW ou du complexe FtsW-PBP3, contre lesquels aucune molécule n'existe à ce jour, ainsi que des molécules liant directement le substrat LII. La FA est une technique de choix pour le test de banques de molécules à haut débit. Malgré le fait que la préparation de Lipide II marqué en quantité suffisante est laborieuse, la miniaturisation du test (10 µl de réaction dans des microplaques adaptées) combinée à la faible quantité de protéine et de LII-NBD utilisée rend faisable le criblage de larges banques de molécules. À titre indicatif nous estimons que 0,9 µmole de LII-NBD, une quantité raisonnablement synthétisable, permettrait le criblage d'environ 100 000 molécules.

D'un point de vue plus fondamental, la méthode développée permet, en outre, d'identifier un potentiel mécanisme d'action d'une nouvelle molécule, en se basant sur les résultats des tests obtenus avec les molécules connues (moénomycine, vancomycine, nisine, ...). En outre, l'étude d'interaction du LII avec les mutants des protéines (PBP1b, MurJ, FtsW et FtsW-PBP3) peut permettre d'identifier facilement des cruciaux au sein de ces protéines pour l'interaction avec leur substrat.

Squalamine et dérivés de type aminostéroles :

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous avons démontré l'effet inhibiteur, concentration dépendante, de la squalamine sur l'activité GTase du PBP1b. D'autres aminostéroles ont été caractérisés mettant en évidence des composés trois fois plus efficaces que la squalamine contre l'activité GTase du PBP1b (composé 2 et 6). La squalamine et le composé 6 déplacent le LII-NBD du PBP1b dans une expérience de compétition en anisotropie de fluorescence comme décrite ci-dessus. Suggérant que la squalamine et les autres aminostéroles actifs contre l'activité GTase exercent leur rôle en empêchant la liaison du substrat au site actif la protéine. Par contre, ces molécules ne semblent pas interagir avec le LII.

La caractérisation de ces composés a permis d'établir certains déterminants importants dans l'inhibition du PBP1b par ces différents dérivés d'aminostéroles. L'ensemble des composés actifs, à l'exception de la squalamine, présentent un groupement non polaire sur le carbone C17 du groupement stérane et un groupement polaire en C3, C6 ou C7. Il est par ailleurs intéressant de noter que le composé 9, un stéréoisomère du composé actif 2 en C7, est pratiquement inactif. La synthèse d'autres composés, avec d'autres variations de substitution, pourrait permettre d'obtenir des composés plus actifs contre l'activité GTase du PBP1b.

Sur base de la similarité structurale du CHAPS et des aminostéroles, nous nous sommes inspirés de la structure du domaine GTase du PBP1a d'*Aquifex aeolicus* (un PBP de classe A comme le PBP1b) liant le CHAPS à proximité du site actif (Yuan *et al.*, 2007) pour réaliser le « docking » du composé 2 au domaine GTase du PBP1b. Il en résulte que la meilleure solution pour la liaison de la partie stéroïdienne se situe au site donneur au niveau du même patch hydrophobe que le CHAPS, bien que dans une configuration un peu différente, et que la chaîne polaire avec la fonction amine pointe vers le glutamate du site actif (E290). La position de cette chaîne est conservée dans tous les composés actifs (composés 3 à 7). Ces composés, et notamment le composé 6 à une chaîne polaire plus longue et donc devrait s'étendre plus loin dans le site actif, pouvant expliquer sa plus grande activité inhibitrice. Dans le cadre de la squalamine, la chaîne polaire se trouve sur un autre carbone et nous supposons donc que le groupement stéroïdien pourrait s'agencer différemment au niveau du patch hydrophobe afin d'orienter sa chaîne polaire vers l'E290 pour interférer avec l'activité GTase.

Étant donné que les aminoséroles actifs entrent en compétition pour la liaison du LII à la protéine (site donneur et accepteur), deux hypothèses peuvent être émises : soit il existe un deuxième site de liaison de ces molécules au niveau du site accepteur du domaine GTase, soit la liaison des aminostéroles au site donneur induit un changement conformationnel empêchant la liaison du LII au site accepteur. Une structure du PBP1b avec un des composés actifs est nécessaire afin d'identifier le ou les sites exacts de liaison de ces molécules. Jusqu'à présent, aucune structure d'un tel complexe n'a pu être obtenue vraisemblablement à cause de la présence de la moénomycine qui présente une affinité pour la protéine largement supérieure à ces composés. La co-cristallisation du composé 6, plus soluble que les autres composés dans l'eau, en absence de moénomycine pourrait permettre d'obtenir une structure du complexe.

La moénomycine est le seul composé de très haute affinité inhibant l'activité GTase de la famille GT51 en se liant au site donneur de l'enzyme. Cependant, cette molécule présente des propriétés pharmacocinétiques assez pauvres probablement en raison de sa partie lipidique : le groupement moénocinole (C25) (Sauvage & Terrak, 2016). On pourrait imaginer le remplacement de cette partie lipidique, adoptant une conformation

désordonnée dans la plupart des structures obtenues, par un aminostérol et ainsi créer des fusions moénomycine-aminostérol. La partie aminostérol de l'antibiotique hybride, en plus de contribuer à l'inhibition des GTases de la famille GT51, pourrait permettre à ces molécules de déstabiliser la membrane externe des bactéries Gram négatif et augmenter l'efficacité de l'antibiotique contre ces bactéries. Le « design » de ce type de molécules, et notamment l'ajout d'un potentiel « linker » entre la moénomycine et l'aminostérol, serait plus aisé après l'obtention de structures de complexes PBP1b-aminostérol.

V. Conclusion et perspectives

La division bactérienne est un processus fondamental orchestré par une machinerie multiprotéique et multienzymatique : le divisome. La plupart de ses constituants sont hautement conservés au sein du monde bactérien.

Au cours de ce travail de thèse, l'étude des protéines FtsBLQ, FtsW-PBP3, PBP1B et FtsN a révélé : un réseau d'interactions complexes avec l'identification de nouvelles interactions, la mise en évidence de complexes multiprotéiques (FtsW-PBP3-FtBLQ...) et une nouvelle vue de la régulation de la synthèse du peptidoglycane septal. FtsBLQ exerce une double répression : sur l'activité GTase du PBP1b, probablement via FtsL, et sur l'activité TPase de PBP3, via FtsQ. La protéine FtsN, quant à elle, lève l'inhibition sur l'activité GTase du PBP1b, déclenchant la synthèse du sPG PBP1b-dépendante. Cette levée d'inhibition a pu être caractérisée davantage. En effet, nous avons démontré l'interaction spécifique entre la région essentielle de FtsN (^EFtsN) et un sillon situé entre le domaine UB2H et le domaine GTase du PBP1b. Nous avons également montré que ^EFtsN était un déterminant essentiel à la stimulation de l'activité GTase du PBP1b et que son interaction avec la protéine PBP1b était un facteur essentiel à la fonctionnalité *in vivo* de cette dernière.

Par ailleurs, nous avons pu mettre au point un test, en anisotropie de fluorescence, de liaison du substrat Lipide II aux protéines PBP1b, FtsW, FtsW-PBP3 et MurJ. Nous avons démontré l'applicabilité de ce test en vue de criblage à haut débit de molécules interférant dans la liaison LII-protéines et/ou liant directement le LII. En outre, ce test nous a permis de comprendre le mécanisme d'inhibition de l'activité GTase du PBP1b par la squalamine et par d'autres aminostéroïdes préalablement caractérisées au cours de cette thèse. En effet, ces molécules semblent lier la protéine et interférer dès lors avec la liaison du substrat Lipide II. Une hypothèse sur le site de liaison de ces molécules a pu être construite.

L'étude des interactions au sein du divisome et la reconstitution de complexes *in vitro* pourrait permettre de développer des molécules antibiotiques interférant dans ces interactions et donc dans le processus de synthèse du PG au site de division. L'obtention de détails moléculaires, notamment par CryoEM, sur l'organisation de ces complexes, permettrait, en plus de la compréhension fondamentale de ces derniers, le développement de molécules modulatrices d'une interaction protéine-protéine essentielle. Ce type de molécule peut empêcher la formation d'un complexe ou au contraire renforcer une interaction en agissant au niveau d'une surface de contact cruciale ou encore en agissant allostériquement à proximité d'une surface de contact menant à des défauts cellulaires et/ou à la mort de la cellule (Cossar *et al.*, 2020). À titre d'exemple, la région C-terminale de FtsZ, en interaction avec ZipA a fait l'objet du développement de molécules et à la découverte d'une molécule liant la surface d'interaction de ZipA avec FtsZ (Rush *et al.*, 2005)

Par ailleurs, la compréhension du système SEDS/bPBP, les structures des complexes RodA/PBP2 et de la protéine MurJ offrent un nouveau champ d'investigation pour le développement d'agents antibactériens. Le test de criblage développé au cours cette thèse pourrait contribuer à la recherche d'inhibiteurs de ces protéines.

La compréhension du divisome, et en particulier la synthèse du sPG et sa régulation, a significativement augmenté ces dernières années. Néanmoins, nous ne sommes encore probablement qu'au début de l'élucidation complète des mécanismes de régulation prenant part au sein du divisome.

VI. Bibliographie

- Aaron, M. et al. (2007) 'The tubulin homologue *FtsZ* contributes to cell elongation by guiding the cell wall precursor synthesis in Caulobacter crescents', *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 64(4), pp. 938–952.
- Aarsman, M. E. G. et al. (2005) « Maturation of the Escherichia coli divisome occurs in two steps », *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 55(6), pp. 1631–1645.
- Abergel, C. et al. (1999) « Structure of the Escherichia coli TolB protein determined by made methods at 1.95 Å resolution », *Structure*, 7(10), pp. 1291–1300.
- Abergel, C. et al. (2001) « Crystallisation and preliminary crystallographic study of the peptidoglycan-associated lipoprotein from Escherichia coli », *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 57(2), pp. 317–319.
- Adam, M. et al. (1991) « Acyl transferase activities of the high-molecular-mass essential penicillin-binding proteins », *Biochemical Journal*, 279(2), pp. 601–604.
- Add-in all, S. G., Cao, C. and Lutkenhaus, J. (1997) 'FtsN, a late recruit to the septum in Escherichia coli', *Molecular Microbiology*, 25(02), pp. 303–309.
- Ago, R. and Shiomi, D. (2019) 'RodZ: A key player in cell elongation and cell division in Escherichia coli', *AIMS Microbiology*, 5(4), pp. 358–367.
- Alcorlo, M. et al. (2019) « Structural basis of denuded glycan recognition by SPOR domains in bacterial cell division », *Nature Communications*. Springer US, 10(1), pp. 1–13.
- Al-dabbagh, B. et al. (2016) « Biochimie Catalytic mechanism of MraY and WecA, two prologues of the polyprenyl-phosphate N-acetylhexosamine 1-phosphate transferase superfamily », *Biochimie*. Elsevier Ltd, 127, pp. 249–257.
- Alexeeva, S. et al. (2010) « Direct interactions of early and late assembling division proteins in Escherichia coli cells resolved by FRET », *Molecular Microbiology*, 77(2), pp. 384–398.
- Alyahya, S. A. et al. (2009) 'RodZ, a component of the bacterial core morphogenic apparatus,' *PNAS*, 106(4), pp. 1239–1244.
- Anderson, B. and Al, E. T. (1965) 'lipid-phosphoacetylmuramyl-pentapeptide and lipid-phosphodisaccharide-pentapeptide: presumed membrane transport intermediates in the cell wall synthesis', *PNAS*, 53(4), pp. 881–889.
- Anilkumar, G. et al. (2001) 'Bacterial cell division protein *FtsZ* is a specific substrate for the AAA family protease *FtsH*', *Microbiology*, 147(3), pp. 516–517.
- Arends, S. J. R. et al. (2010) 'Discovery and Characterisation of Three New Escherichia coli Septal Ring Proteins That Contain a SPOR Domain: DamX, DedD, and RlpA', *Journal of Bacteriology*, 192(1), pp. 242–255.
- Arends, S. J. R., Kustusch, R. J. and Weiss, D. S. (2009) 'ATP-binding site lesions in *FtsE* impair cell division', *Journal of bacteriology*, 191(12), pp. 3772–3784.
- Arthur, M. and Courvalin, P. (1993) 'Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(8), pp. 1563–1571.
- Arthur, M. et al. (1993) 'Characterisation of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of desipeptide peptidoglycan precursors in Enterococcus faecium BM4147', *Journal of Bacteriology*, 175(1), p. 117 LP-127.
- Arthur, M., Reynolds, P. and Courvalin, P. (1996) 'Glycopeptide resistance in enterococci', *Trends in Microbiology*, 4(10), pp. 401–407.
- Atkinson, D. J. et al. (2016) 'Enduracididine, a rare amino acid component of peptide antibiotics: Natural products and synthesis,' *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 12, pp. 2325–2342.
- Atrihi, A. et al. (1999) « Analysis of peptidoglycan structure from vegetative cells of *Bacillus subtilis* 168 and role of PBP 5 in peptidoglycan maturation », *Journal of Bacteriology*, 181(13), p. 3956 LP-3966.
- Aubry, C. et al. (2011) 'OatA, a Peptidoglycan O-acetyltransferase Involved in *Listeria monocytogenes* immune escape, is critical for virulence,' *The Journal of Infectious Diseases*, 204(5), pp. 731–740.

- Aussies, N. et al. (2003) 'The Bacterial Cytoskeleton : An Intermediate Filament-Like Function in Cell Shape,' *Cell*, 115, pp. 705–713.
- Ayako, N. et al. (1992) « Cloning of a gene from *Bacillus cereus* with homology to the *mreB* gene from *Escherichia coli* », *Gene*, 122(1), pp. 181–185.
- Ayed, S. H. et al. (2017) 'Dissecting the role of conformational change and membrane binding by the bacterial cell division regulator MinE in the stimulation of MinD ATPase activity,' *Journal of Biological Chemistry*, 292(50), pp. 20732–20743.
- Baba, T. et al. (2006) 'Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection', *Molecular Systems Biology*, 2(1). doi: 10.1038/msb4100050.
- Banzhaf, M. et al. (2012) 'Cooperativity of peptidoglycan synthases active in bacterial cell elongation,' *Molecular Microbiology*, 85(1), pp. 179–194.
- Banzhaf, M. et al. (2020) « Outer membrane lipoprotein NlpI scaffolds peptidoglycan hydrolases within multi-enzyme complexes in *Escherichia coli* », *The EMBO Journal*, 39(5).
- Baranova, N. et al. (2020) 'Diffusion and capture permits dynamic coupling between treadmilling *FtsZ* filaments and cell division proteins,' *Nature Microbiology*, 5(3), pp. 407–417.
- Barreteau, H. et al. (2008) 'Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis,' *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), pp. 168–207.
- Begg, K. J., Dewar, S. J. and Donachie, W. D. (1995) 'A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*', *Journal of bacteriology*, 177(21), pp. 6211–6222.
- Benachour, A. et al. (2012) 'The lysozyme-induced peptidoglycan N -acetylglucosamine deacetylase PgdA (EF1843) is Required for *Enterococcus faecalis*,' *Journal of bacteriology*, 194(22), pp. 6066–6073.
- Bendezú, F. O. and de Boer, P. A. J. (2008) 'Conditional lethality, division defects, membrane involution, and endocytosis in mre and mrd shape mutants of *Escherichia coli*', *Journal of bacteriology*. 2007/11/09. American Society for Microbiology (ASM), 190(5), pp. 1792–1811.
- Bendezú, F. O. et al. (2009) « RodZ (YfgA) is required for proper assembly of the MreB actin cytoskeleton and cell shape in *E. coli* », *The EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd., 28(3), pp. 193–204.
- Berezuk, A. M. et al. (2020) *FtsA G50E Mutant Suppresses the Essential Requirement for FtsK During Bacterial Cell Division in Escherichia coli*, *Canadian Journal of Microbiology*, 4120, pp. 1-43.
- Berezuk, A. M., Goodyear, M. and Khursigara, C. M. (2014) 'Site-directed fluorescence labelling reveals a revised N-terminal membrane topology and functional periplasmic residues in the *Escherichia coli* cell division protein *FtsK*', *Journal of Biological Chemistry*, 289(34), pp. 23287–23301.
- Bernard, C. S. et al. (2007) « An altered *FtsA* can compensate for the loss of essential cell division protein *FtsN* in *Escherichia coli* », *Molecular Microbiology*, 64(5), pp. 1289–1305.
- Bernard, E. et al. (2011) « Characterization of O-acetylation of N-acetylglucosamine », *Journal of Biological Chemistry*, 286(27), pp. 23950–23958.
- Bernhardt TG, Wang IN, Struck DK, Y. R. (2001a) 'A Protein Antibiotic in the Phage Qbeta Virion: Diversity in Lysis Targets', *Science*, 292(5525), pp. 2326–2329.
- Bernhardt, T. G. and De Boer, P. A. J. (2003) « The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway », *Molecular Microbiology*, 48(5), pp. 1171–1182.
- Bernhardt, T. G. and de Boer, P. a. J. (2005) 'SlmA, a Nucleoid-Associated, *FtsZ* Binding Protein Required for Blocking Septal Ring Assembly over Chromosomes in *E. coli*', *Molecular Cell*, 18(5), pp. 555–564.
- Bernhardt, T. G., Struck, D. K. and Young, R. (2001b) 'The Lysis Protein E of ϕ X174 Is a Specific Inhibitor of the MraY-catalyzed Step in Peptidoglycan Synthesis', *Journal of Biological Chemistry*, 276(9), pp. 6093–6097.
- Bernstein, A., Rolfe, B. and Onodera, K. (1972) 'Pleiotropic properties and genetic organization of the *tolA*, *B* locus of *Escherichia coli* K-12', *Journal of bacteriology*, 112(1), pp. 74–83.

- Bertsche, U. et al. (2006) 'Interaction between two murein (peptidoglycan) synthases, PBP3 and PBP1B, in *Escherichia coli*', *Molecular Microbiology*, 61(3), pp. 675–690.
- Bi, E. and Lutkenhaus, J. (1990) 'Analysis of *ftsZ* mutations that confer resistance to the cell division inhibitor SulA (SfiA)', *Journal of bacteriology*, 172(10), pp. 5602–5609.
- Bierbaum, G. and Sahl, H.-G. (2009) 'Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering', *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), pp. 2–18.
- Bigot, S. et al. (2004) 'FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein', *Molecular Microbiology*, 54(4), pp. 876–886.
- Billings, G. et al. (2014) 'De novo morphogenesis in L-forms via geometric control of cell growth', *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 93(5), pp. 883–896.
- Bisicchia, P., Steel, B. and Debela, M. H. M. (2013) 'The N-Terminal Membrane-Spanning Domain of the *Escherichia coli* DNA Translocase FtsK Hexamerizes at Midcell', *mBio*, 4(6), pp. 1–6.
- Bisson-Filho, A. W. et al. (2017) 'Treadmilling by *FtsZ* filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division', *Science*, 355(6326), pp. 739–743.
- Blackburn, N. T. and Clarke, A. J. (2001) 'Identification of Four Families of Peptidoglycan Lytic Transglycosylases', *Journal of Molecular Evolution*, 52(1), pp. 78–84.
- Blair, K. M. et al. (2018) « The *Helicobacter pylori* cell shape promoting protein Csd5 interacts with the cell wall, MurF, and the bacterial cytoskeleton », *Molecular microbiology*. 2018/09/28, 110(1), pp. 114–127.
- Boes, A. et al. (2019) 'Regulation of the Peptidoglycan Polymerase Activity of PBP1b by Antagonist Actions of the Core Divisome Proteins FtsBLQ and FtsN', *mBio*, 10(1).
- Bolla, J. R. et al. (2018) 'Direct observation of the influence of cardiolipin and antibiotics on lipid II binding to MurI', *nature chemistry*, 10(3), pp. 363–371.
- Boneca, I. G. et al. (2007) 'A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system', *PNAS*, 104(3), pp. 997–1002.
- Bonis, M. et al. (2010) « A M23B family metallopeptidase of *Helicobacter pylori* required for cell shape, pole formation and virulence », *Molecular Microbiology*, 78(4), pp. 809–819.
- Bonis, M. et al. (2012) « The Effect of Bulgecin A on Peptidoglycan Metabolism and Physiology of *Helicobacter pylori* », *Microbial Drug Resistance*, 18(3), pp. 230–239.
- Bonsor, D. A. et al. (2007) « Molecular Mimicry Enables Competitive Recruitment by a Natively Disordered Protein », *Journal of the American Chemical Society*, 129(15), pp. 4800–4807.
- Bonsor, D. A. et al. (2009) « Allosteric β-propeller signalling in TolB and its manipulation by translocating colicins », *The EMBO Journal*, 28(18), pp. 2846–2857.
- Born, P., Breukink, E. and Vollmer, W. (2006) 'In vitro synthesis of cross-linked murein and its attachment to sacculi by PBP1A from *Escherichia coli*', *Journal of Biological Chemistry*, 281(37), pp. 26985–26993.
- Born, P., Breukink, E. and Vollmer, W. (2006) 'In Vitro Synthesis of Cross-linked Murein and Its Attachment to Sacculi by PBP1A from *Escherichia coli*', *Journal of Biological Chemistry*, 281(37), pp. 26985–26993.
- Bouhss, A. et al. (2004) « Purification and Characterization of the Bacterial MraY Translocase Catalyzing the First Membrane Step of Peptidoglycan Biosynthesis », *Journal of Biological Chemistry*, 279(29), pp. 29974–29980.
- Bouhss, A. et al. (2008) 'The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates', *FEMS Microbiology Letters*, 32(2), pp. 208–233.
- Bouveret, E. et al. (1995) « Peptidoglycan-associated lipoprotein-TolB interaction. A possible key to explaining the formation of contact sites between the inner and outer membranes of *Escherichia coli*」, *Journal of Biological Chemistry*, 270(19), pp. 11071–11077.

- Boyle-Vavra, S. et al. (2001) 'A spectrum of changes occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide-intermediate clinical *Staphylococcus aureus* isolates', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(1), p. 280 LP-287.
- Brandish, P. E. et al. (1996a) 'Modes of action of tunicamycin, liposidomycin B, and mureidomycin A: inhibition of phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide translocase from *Escherichia coli*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(7), pp. 1640 LP – 1644.
- Brandish, P. E. et al. (1996b) 'Slow Binding Inhibition of Phospho- N -acetylmuramyl-pentapeptide-translocase (*Escherichia coli*) by Mureidomycin A', *Journal of Biological Chemistry*, 271(13), pp. 7609–7614..
- Bratton, B. P. et al. (2018) 'MreB polymers and curvature localization are enhanced by RodZ and predict *E. coli*'s cylindrical uniformity', *Nature Communications*. Springer US, 9(1), p. 2797.
- Braun, V. and Herrmann, C. (1993) 'Evolutionary relationship of uptake systems for biopolymers in *Escherichia coli*: cross-complementation between the TonB-ExxB-ExbD and the TolA-TolQ-TolR proteins', *Molecular Microbiology*, 8(2), pp. 261–268.
- Breukink, E. et al. (1997) 'The C-Terminal Region of Nisin Is Responsible for the Initial Interaction of Nisin with the Target Membrane +', *Biochemistry*, 36(23), pp. 6968–6976.
- Breukink, E. et al. (2003) 'Lipid II Is an Intrinsic Component of the Pore Induced by Nisin in Bacterial Membranes', *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), pp. 19898–19903.
- Briegel, A. et al. (2006) 'Multiple large filament bundles observed in *Caulobacter crescentus* by electron cryotomography', *Molecular Microbiology*, 62(1), pp. 5–14.
- Brown, L. et al. (2015) 'Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 13(10), pp. 620–630.
- 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', *Molecular Microbiology*, 52(5), pp. 1315–1327.
- Bugg, T. D. H. and Roper, A. J. L. and D. I. (2006) 'Phospho-murNAc-pentapeptide translocase (MraY) as a target for antibacterial agents and antibacterial proteins', *Infectious Disorders - Drug Targets*, pp. 85–106.
- Bui, N. K. et al. (2012) 'Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*', *Analytical Biochemistry*, 421(2), pp. 657–666.
- Bunkóczki, G., Vértesy, L. and Sheldrick, G. M. (2005) 'Structure of the lipopeptide antibiotic tsushimycin', *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 61(8), pp. 1160–1164.
- Busiek, K. K. and Margolin, W. (2014) 'A role for *FtsA* in SPOR-independent localization of the essential *E. coli* cell division protein *FtsN*', *Molecular Microbiology*, 92(6), pp. 1212–1226.
- Busiek, K. K. et al. (2012) 'The Early Divisome Protein *FtsA* Interacts Directly through Its 1c: Subdomain with the Cytoplasmic Domain of the Late Divisome: Protein *FtsN*', *Journal of Bacteriology*, 194(8), pp. 1989–2000.
- Buss, J. A. et al. (2017) 'ZapA and ZapB form an *FtsZ*-independent structure at midcell', 104(March), pp. 652–663.
- Buss, J. et al. (2015) « A multi-layered protein network stabilizes the *Escherichia coli* *FtsZ*-ring and modulates constriction dynamics », *PLoS genetics*. Public Library of Science, 11(4), pp. e1005128–e1005128.
- Butaye, P. et al. (2000) 'Influence of different medium components on the in vitro activity of the growth-promoting antibiotic flavomycin against enterococci', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(5), pp. 713–716.
- Butler, E. K. et al. (2013) 'Structure-Function Analysis of MurJ Reveals a Solvent-Exposed Cavity Containing Residues Essential for Peptidoglycan Biogenesis in *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 195(20), pp. 4639–4649.
- Butler, E. K. et al. (2014) 'Charge Requirements of Lipid II Flippase Activity in *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 196(23), pp. 4111–4119.
- Cabeen, M. T. and Jacobs-Wagner, C. (2007) 'Skin and bones: the bacterial cytoskeleton, cell wall, and cell morphogenesis', *Journal of Cell Biology*, 179(3), pp. 381–387.

Cabeen, M. T. et al. (2009) 'Bacterial cell curvature through mechanical control of cell growth', *The EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 28(9), pp. 1208–1219.

Cabeen, M. T. et al. (2010) 'Mutations in the Lipopolysaccharide Biosynthesis Pathway Interfere with Crescentin-Mediated Cell Curvature in Caulobacter crescentus', *Journal of Bacteriology*, 192(13), pp. 3368–3378.

Caccamo, P. D. and Brun, Y. V. (2018) 'The Molecular Basis of Noncanonical Bacterial Morphology', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 26(3), pp. 191–208.

Caldas, P. et al. (2019) « Cooperative ordering of treadmilling filaments in cytoskeletal networks of *FtsZ* and its crosslinker *ZapA* », *Nature Communications*. Springer US, 10(1), p. 5744.

Cameron, T. A. et al. (2014) 'Peptidoglycan synthesis machinery in *Agrobacterium tumefaciens* during unipolar growth and cell division', *mBio*, 5(3), pp. 1–10.

Carballido-lópez, R. (2006) 'Orchestrating bacterial cell morphogenesis', *Molecular Microbiology*, 60(4), pp. 815–819.

Cascales, E. et al. (2000) 'Proton motive force drives the interaction of the inner membrane TolA and outer membrane Pal proteins in *Escherichia coli*', *Molecular Microbiology*, 38(4), pp. 904–915.

Cascales, E. et al. (2002) 'Pal Lipoprotein of *Escherichia coli* Plays a Major Role in Outer Membrane Integrity', *Journal of Bacteriology*, 184(3), pp. 754–759.

Cascales, E., Lloubès, R. and Sturgis, J. N. (2001) 'The TolQ-TolR proteins energize TolA and share homologies with the flagellar motor proteins MotA-MotB', *Molecular Microbiology*, 42(3), pp. 795–807.

Celia, H. et al. (2016) 'Structural insight into the role of the Ton complex in energy transduction', *Nature*, 538(7623), pp. 60–65.

Celia, H. et al. (2019) 'Cryo-EM structure of the bacterial Ton motor subcomplex ExbB–ExbD provides information on structure and stoichiometry', *Communications Biology*, 2(1), p. 358.

Chamakura, K. R. et al. (2017) « A viral protein antibiotic inhibits lipid II flippase activity », *Nature Microbiology*, 2(11), pp. 1480–1484.

Chan, A. C. K. et al. (2015) « Helical shape of *Helicobacter pylori* requires an atypical glutamine as a zinc ligand in the carboxypeptidase Csd4', *The Journal of biological chemistry*. 2014/12/12. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 290(6), pp. 3622–3638.

Chang, J. D. et al. (2017) 'Peptidoglycan O-acetylation increases in response to vancomycin treatment in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*', *Scientific Reports*, 7, p. 46,500.

Charbon, G., Cabeen, M. T. and Jacobs-Wagner, C. (2009) 'Bacterial intermediate filaments: *in vivo* assembly, organization, and dynamics of crescentin', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 23(9), pp. 1131–1144.

Chen, J. C. and Beckwith, J. (2001) 'FtsQ, FtsL and FtsI require FtsK, but not FtsN, for co-localization with FtsZ during *Escherichia coli* cell division', *Molecular Microbiology*, 42(2), pp. 395–413.

Chen, Y. and Erickson, H. P. (2009) 'FtsZ filament dynamics at steady state: subunit exchange with and without nucleotide hydrolysis', *Biochemistry*, 48(28), pp. 6664–6673.

Chen, Y. et al. (2005) « A rapid fluorescence assay for *FtsZ* assembly indicates cooperative assembly with a dimer nucleus », *Biophysical journal*. 2004/10/08. The Biophysical Society, 88(1), pp. 505–514.

Cheng, Q. and Park, J. T. (2002) 'Substrate Specificity of the AmpG Permease Required for Recycling of Cell Wall Anhydro-Muropeptides', *Journal of Bacteriology*, 184(23), pp. 6434–6436.

Cheng, T.-J. R. et al. (2008) 'Domain requirement of moenomycin binding to bifunctional transglycosylases and development of high-throughput discovery of antibiotics', *PNAS*, 105(2), pp. 431–436.

Cheng, T.-J. R. et al. (2008) 'Domain requirement of moenomycin binding to bifunctional transglycosylases and development of high-throughput discovery of antibiotics', *PNAS*, 105(2), pp. 431–436.

- Cheng, T.-J. R. et al. (2010) 'High-throughput identification of antibacterials against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the transglycosylase', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(24), pp. 8512–8529.
- Cheng, X. et al. (1994) 'The structure of bacteriophage T7 lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase.', *PNAS*, 91(9), pp. 4034–4038.
- Chmara, H. et al. (1991) 'Bacteriolytic effect of teicoplanin', *Journal of General Microbiology*, 137(4), pp. 913–919.
- Cho, H. and Bernhardt, T. G. (2013) 'Identification of the SlmA Active Site Responsible for Blocking Bacterial Cytokinetic Ring Assembly over the Chromosome', *PLOS Genetics*. Public Library of Science, 9(2), p. e1003304.
- Cho, H. et al. (2011) 'Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated *FtsZ* polymerization antagonist', *PNAS*, 108(9), pp. 3773–3778.
- Cho, H. et al. (2016) 'Bacterial cell wall biogenesis is mediated by SEDS and PBP polymerase families functioning semi-autonomously', *Nature Microbiology*, 1(10), p. 16172.
- Choi, Y. et al. (2018) « Structural Insights into the *FtsQ/FtsB/FtsL* Complex, a Key Component of the Divisome », *Scientific Reports*. Springer US, 8(1), pp. 1–12.
- Chugunov, A. et al. (2013) "Lipid-II forms potential "landing terrain" for lantibiotics in simulated bacterial membrane", *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 3, p. 1678.
- Chung, B. C. et al. (2013) 'Crystal structure of MraY, an essential membrane enzyme for bacterial cell wall synthesis', *Science*, 341(6149), p. 1012 LP-1016.
- Clavel, T. et al. (1998) 'TolB protein of *Escherichia coli* K-12 interacts with the outer membrane peptidoglycan-associated proteins Pal, Lpp and OmpA', *Molecular Microbiology*, 29(1), pp. 359–367.
- Cleveland, R. F. et al. (1976) 'Inhibition of wall autolysis in *Streptococcus faecalis* by lipoteichoic acid and lipids', *Journal of bacteriology*, 126(1), pp. 192–197.
- Cleverley, R. M. et al. (2019) « The cell cycle regulator GpsB functions as cytosolic adaptor for multiple cell wall enzymes », *Nature communications*. Nature Publishing Group UK, 10(1), p. 261.
- Cochrane, S. A. et al. (2016) 'Antimicrobial lipopeptide tridecaptin A 1 selectively binds to Gram-negative lipid II', *PNAS*, 113(41), pp. 11561–11566.
- Colavin, A., Hsin, J. and Huang, K. C. (2014) 'Effects of polymerization and nucleotide identity on the conformational dynamics of the bacterial actin homolog MreB', *PNAS*, 111(9), pp. 3585 LP – 3590.
- Colavin, A., Shi, H. and Huang, K. C. (2018) 'RodZ modulates geometric localization of the bacterial actin MreB to regulate cell shape', *Nature Communications*, 9(1), p. 1280.
- Coltharp, C. et al. (2016) 'Defining the rate-limiting processes of bacterial cytokinesis', *PNAS*, 113(8), pp. E1044–E1053.
- Concha, N. et al. (2016) 'Discovery and Characterization of a Class of Pyrazole Inhibitors of Bacterial Undécaprényl Pyrophosphate Synthase', *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(15), pp. 7299–7304.
- Condon, S. G. F. et al. (2018) 'The *FtsLB* subcomplex of the bacterial divisome is a tetramer with an uninterrupted *FtsL* helix linking the transmembrane and periplasmic regions', *Journal of Biological Chemistry*, 293(5), pp. 1623–1641.
- Conti, J., Viola, M. G. and Camberg, J. L. (2018) 'FtsA reshapes membrane architecture and remodels the Z-ring in *Escherichia coli*', *Molecular microbiology*, 107(4), pp. 558–576.
- Contreras-Martel, C. et al. (2017) « Molecular architecture of the PBP2–MreC core bacterial cell wall synthesis complex », *Nature Communications*, 8(1), p. 776.
- Corbin, B. D. et al. (2004) « Z-Ring-Independent Interaction between a Subdomain of FtsA and Late Septation Proteins as Revealed by a Polar Recruitment Assay », *Journal of Bacteriology*, 186(22), pp. 7736–7744.
- Corbin, B. D. et al. (2007) « Interaction between Cell Division Proteins FtsE and FtsZ », *Journal of Bacteriology*, 189(8), pp. 3026–3035.

- Cordell, S. C. and Löwe, J. (2001a) 'Crystal structure of the bacterial cell division regulator MinD', *FEBS Letters*. John Wiley & Sons, Ltd, 492(1–2), pp. 160–165.
- Cordell, S. C. et al., (2001b) 'Crystal structure of the bacterial cell division inhibitor MinC', *The EMBO Journal*, 20(10), pp. 2454–2461.
- Cossar, P. J., Lewis, P. J. and McCluskey, A. (2020) 'Protein-protein interactions as antibiotic targets: A medicinal chemistry perspective', *Medicinal Research Reviews*, 40(2), pp. 469–494.
- Courtin, P. et al. (2006) « Peptidoglycan Structure Analysis of Lactococcus lactis Reveals the Presence of an I,d-Carboxypeptidase Involved in Peptidoglycan Maturation », *Journal of Bacteriology*, 188(14), pp. 5293–5298.
- Crow, A. et al. (2017) « Structure and mechanotransmission mechanism of the MacB ABC transporter superfamily », *PNAS*, 114(47), pp. 12572–12577.
- Cudic, P. et al. (2002) « Complexation of peptidoglycan intermediates by the lipoglycodepsipeptide antibiotic ramoplanin: Minimal structural requirements for intermolecular complexation and fibril formation », *PNAS*, 99(11), pp. 7384–7389.
- Culp, E. J. et al. (2020) « Evolution-guided discovery of antibiotics that inhibit peptidoglycan remodelling », *Nature*. Springer US, 578(7796), pp. 582–587.
- Cuthbertson, L. and Nodwell, J. R. (2013) 'The TetR family of regulators', *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. American Society for Microbiology, 77(3), pp. 440–475.
- Dai, K., Xu, Y. and Lutkenhaus, J. (1996) 'Topological characterization of the essential Escherichia coli cell division protein FtsN.', *Journal of bacteriology*, 178(5), pp. 1328–1334.
- Dam, V. Van et al. (2007) 'Transmembrane transport of peptidoglycan precursors across model and bacterial membranes', *Molecular Microbiology*, 64(4), pp. 1105–1114.
- Dandliker, W. B. et al. (1981) 'Equilibrium and kinetic inhibition assays based upon fluorescence polarization', in *Methods in Enzymology*, pp. 3–28.
- Daniel, R. A. and Errington, J. (2003) 'Control of Cell Morphogenesis in Bacteria: Two Distinct Ways to Make a Rod-Shaped Cell', *Cell*. Elsevier, 113(6), pp. 767–776.
- Davies, C., White, S. W. and Nicholas, R. A. (2001) 'Crystal Structure of a Deacylation-defective Mutant of Penicillin-binding Protein 5 at 2.3-Å Resolution', *Journal of Biological Chemistry*, 276(1), pp. 616–623.
- De Boer, P. A. (2010) « Advances in understanding E. coli cell fission », *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 13(6), pp. 730–737.
- de Boer, P. A. J., Crossley, R. E. and Rothfield, L. I. (1989) 'A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in E. coli', *Cell*. Elsevier, 56(4), pp. 641–649.
- De Leeuw, E. et al. (1999) 'Molecular characterization of Escherichia coli FtsE and FtsX', *Molecular Microbiology*, 31(3), pp. 983–993.
- Deghorain, M. et al. (2011) « A Defined Terminal Region of the E. coli Chromosome Shows Late Segregation and High FtsK Activity », *PLoS ONE*. Edited by M. G. Marinus, 6(7), p. e22164.
- Del Portillo, F. G. and De Pedro, M. A. (1991) 'Penicillin-Binding Protein 2 is essential for the integrity of growing cells of Escherichia coli ponB strains', *Journal of Bacteriology*, 173(14), p. 4530 LP-4532.
- Del Río, A. et al. (2016) « Fosfomycin plus β-Lactams as Synergistic Bactericidal Combinations for Experimental Endocarditis Due to Methicillin-Resistant and Glycopeptide-Intermediate Staphylococcus aureus », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(1), pp. 478–486.
- Demchick, P. and Koch, A. L. (1996) 'The permeability of the wall fabric of Escherichia coli and Bacillus subtilis.', *Journal of bacteriology*, 178(3), pp. 768–773.
- Deme, J. C. et al. (2020) 'Structures of the stator complex that drives rotation of the bacterial flagellum 2', *bioRxiv*.
- den Blaauwen, T. and Luijink, J. (2019) 'Checks and Balances in Bacterial Cell Division', *mBio*, 10(1).

- Den Blaauwen, T. et al. (2008) 'Morphogenesis of rod-shaped sacculi', *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), pp. 321–344.
- Den Blaauwen, T. et al. (2008) 'Morphogenesis of rod-shaped sacculi', *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), pp. 321–344.
- Dennis, J. J., Lafontaine, E. R. and Sokol, P. A. (1996) 'Identification and characterization of the tolQRA genes of *Pseudomonas aeruginosa*', *Journal of bacteriology*, 178(24), pp. 7059–7068.
- Denome, S. A. et al. (1999) 'Escherichia coli mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis', *Journal of Bacteriology*, 181(13), p. 3981 LP-3993.
- Derouaux, A. et al. (2008) 'The Monofunctional Glycosyltransferase of Escherichia coli Localizes to the Cell Division Site and Interacts with Penicillin-Binding Protein 3, *FtsW*, and *FtsN*', *Journal of Bacteriology*, 190(5), pp. 1831–1834.
- Derouaux, A. et al. (2011) 'Small molecule inhibitors of peptidoglycan synthesis targeting the lipid II precursor', *Biochemical Pharmacology*, 81(9), pp. 1098–1105.
- Derouiche, R. et al. (1995) « Protein complex within Escherichia coli inner membrane. TolA N-terminal domain interacts with TolQ and TolR proteins », *Journal of Biological Chemistry*, 270(19), pp. 11078–11084.
- Di Berardino, M. et al. (1996) 'The monofunctional glycosyltransferase of Escherichia coli is a member of a new class of peptidoglycan-synthesising enzymes', *FEBS Letters*, 392(2), pp. 184–188.
- Di Lallo, G. et al. (2003) 'Use of a two-hybrid assay to study the assembly of a complex multicomponent protein machinery: bacterial septosome differentiation', *Microbiology*, 149(12), pp. 3353–3359.
- Dias, R. de O. and Franco, O. L. (2015) « Cysteine-stabilized $\alpha\beta$ defensins: From a common fold to antibacterial activity », *Peptides*, 72, pp. 64–72.
- Díez-Aguilar, M. and Cantón, R. (2019) 'New microbiological aspects of fosfomycin', *Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 32, pp. 8–18.
- Dillard, J. P. and Hackett, K. T. (2005) 'Mutations affecting peptidoglycan acetylation in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*', *Infection and immunity*, 73(9), pp. 5697–5705.
- Dion, M. F. et al. (2019) « Bacillus subtilis cell diameter is determined by the opposing actions of two distinct cell wall synthetic systems », *Nature Microbiology*. Springer US, 4(8), pp. 1294–1305.
- Divakaruni, A. V. et al. (2005) « The cell-shape protein MreC interacts with extracytoplasmic proteins including cell wall assembly complexes in *Caulobacter crescentus* », *PNAS*, 102(51), pp. 18602–18607.
- Do, T., Page, J. E. and Walker, S. (2020) 'Uncovering the activities, biological roles, and regulation of bacterial cell wall hydrolases and tailoring enzymes', *Journal of Biological Chemistry*, 295(10), pp. 3347–3361.
- Do, T., Page, J. E. and Walker, S. (2020) 'Uncovering the activities, biological roles, and regulation of bacterial cell wall hydrolases and tailoring enzymes', *Journal of Biological Chemistry*, 295(10), pp. 3347–3361.
- Domínguez-Escobar, J. et al. (2011) 'Processive Movement of MreB-Associated Cell Wall Biosynthetic Complexes in Bacteria', *Science*, 333(6039), pp. 225 LP – 228.
- Dorazi, R. and Dewar, S. J. (2000) 'Membrane topology of the N-terminus of the Escherichia coli *FtsK* division protein', *FEBS Letters*, 478(1–2), pp. 13–18.
- Douafer, H. et al. (2019) « Antibiotic Adjuvants: Make Antibiotics Great Again! », *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(19), pp. 8665–8681.
- Draper, G. C. et al. (1998) « Only the N-terminal domain of *FtsK* functions in cell division », *Journal of bacteriology*, 180(17), pp. 4621–4627.
- Du, S. and Lutkenhaus, J. (2014) 'SlmA Antagonism of *FtsZ* Assembly Employs a Two-pronged Mechanism like MinCD', *PLoS Genetics*, 10(7).
- Du, S. and Lutkenhaus, J. (2017) 'Assembly and activation of the Escherichia coli divisome', *Molecular Microbiology*, 105(2), pp. 177–187.

- Du, S. et al. (2018) « *FtsZ* filaments have the opposite kinetic polarity of microtubules », *PNAS*, 115(42), pp. 10768–10773.
- Du, S. et al. (2019) « How *FtsEX* localizes to the Z ring and interacts with *FtsA* to regulate cell division », *Molecular Microbiology*, 112(3), pp. 881–895.
- 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’, *Molecular microbiology*, 95(2), pp. 173–188.
- Du, S., Pichoff, S. and Lutkenhaus, J. (2016) ‘*FtsEX* acts on *FtsA* to regulate divisome assembly and activity’, *PNAS*, 113(34), pp. 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*’, *The EMBO Journal*, 29(3), pp. 597–605.
- Dubarry, N., Possoz, C. and Barre, F. X. (2010) ‘Multiple regions along the *Escherichia coli* *FtsK* protein are implicated in cell division’, *Molecular Microbiology*, 78(5), pp. 1088–1100.
- Duncan, T. R. et al. (2013) ‘Identification of SPOR Domain Amino Acids Important for Septal Localization, Peptidoglycan Binding, and a Disulfide Bond in the Cell Division Protein *FtsN*’, *Journal of Bacteriology*, 195(23), pp. 5308–5315.
- Dupaigne, P. et al. (2012) « Molecular Basis for a Protein-Mediated DNA-Bridging Mechanism that Functions in Condensation of the *E. coli* Chromosome », *Molecular Cell*, 48(4), pp. 560–571.
- Durand-Heredia, J. et al. (2012) ‘Identification of ZapD as a cell division factor that promotes the assembly of *FtsZ* in *Escherichia coli*’, *Journal of Bacteriology*, 194(12), pp. 3189–3198.
- Durand-Heredia, J. M. et al. (2011) ‘Identification and characterization of ZapC, a stabilizer of the *FtsZ* ring in *Escherichia coli*’, *Journal of bacteriology*, 193(6), pp. 1405–1413.
- Dye, N. A. et al. (2005) ‘Two independent spiral structures control cell shape in *Caulobacter*’, *PNAS*, 102(51), pp. 18608–18613.
- Dye, N. A. et al. (2011) « Mutations in the nucleotide binding pocket of MreB can alter cell curvature and polar morphology in *Caulobacter* », *Molecular microbiology*. 2011/05/26. Blackwell Publishing Ltd, 81(2), pp. 368–394.
- Ebersbach, G. et al. (2008) ‘Novel coiled-coil cell division factor ZapB stimulates Z ring assembly and cell division’, *Molecular Microbiology*, 68(3), pp. 720–735.
- Eckert, C. et al. (2006) ‘Functional Analysis of AtlA, the Major N-Acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*’, *Journal of Bacteriology*, 188(24), pp. 8513–8519.
- Egan, A. J. F. and Vollmer, W. (2013) ‘The physiology of bacterial cell division’, *Annals of the New York Academy of Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, 1277(1), pp. 8–28..
- Egan, A. J. F. et al. (2014) ‘Outer-membrane lipoprotein LpoB spans the periplasm to stimulate the peptidoglycan synthase PBP1B’, *PNAS*, 111(22), pp. 8197–8202.
- Egan, A. J. F. et al. (2014) ‘Outer-membrane lipoprotein LpoB spans the periplasm to stimulate the peptidoglycan synthase PBP1B’, *PNAS*, 111(22), pp. 8197–8202.
- Egan, A. J. F. et al. (2014) ‘Outer-membrane lipoprotein LpoB spans the periplasm to stimulate the peptidoglycan synthase PBP1B’, *PNAS*, 111(22), pp. 8197–8202.
- Egan, A. J. F. et al. (2015) ‘Activities and regulation of peptidoglycan synthases’, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1679), p. 20,150,031.
- Egan, A. J. F. et al. (2018) ‘Induced conformational changes activate the peptidoglycan synthase PBP1B’, *Molecular Microbiology*, 110(3), pp. 335–356.
- El Ghachi, M. et al. (2004) ‘The bacA gene of *Escherichia coli* Encodes an undécaprényl pyrophosphate phosphatase activity’, *The Journal of biological chemistry*, 279(29), pp. 30106–30113.

El Ghachi, M. et al. (2005) 'Identification of multiple genes encoding membrane proteins with undécaprényl pyrophosphate phosphatase (UppP) activity in Escherichia coli', *The Journal of biological chemistry*, 280(19), pp. 18689–18695.

El Ghachi, M. et al. (2011) 'Characterization of the elongasome core PBP2:MreC complex of Helicobacter pylori', *Molecular Microbiology*, 82(1), pp. 68–86.

Elhenawy, W. et al. (2016) 'The O-antigen flippase Wzk can substitute for MurJ in Peptidoglycan synthesis in Helicobacter pylori and Escherichia coli', *PLOS ONE*, 11(8), pp. 1–16.

Elsebaei, M. M. et al. (2019) 'Lipophilic efficient phenylthiazoles with potent undécaprényl pyrophosphatase inhibitory activity', *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS, 175, pp. 49–62.

Elsen, N. L. et al. (2012) 'Mechanism of Action of the Cell-Division Inhibitor PC190723: Modulation of *FtsZ* Assembly Cooperativity', *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 134(30), pp. 12342–12345.

Emami, K. et al. (2017) 'RodA as the missing glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* and antibiotic discovery for the peptidoglycan polymerase pathway', *Nature Microbiology*, 2(3), p. 16,253.

Emsley, P. et al. (2010) 'Features and development of Coot', *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66(4), pp. 486–501.

Emsley, P. et al. (2010) 'Features and development of Coot', *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66(4), pp. 486–501.

Erickson, H. P. (2001) 'The *FtsZ* protofilament and attachment of ZipA—structural constraints on the *FtsZ* power stroke', *Current Opinion in Cell Biology*, 13(1), pp. 55–60.

Erickson, H. P. (2017) 'How bacterial cell division might cheat turgor pressure - a unified mechanism of septal division in Gram-positive and Gram-negative bacteria', *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2017/07/12, 39(8).

Erickson, H. P., Anderson, D. E. and Osawa, M. (2010) 'FtsZ in Bacterial Cytokinesis: Cytoskeleton and Force Generator All in One', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(4), pp. 504–528. Löwe, J. and Amos, L. A. (1998) 'Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ', *Nature*, 391(6663), pp. 203–206.

Espaillat, A. et al. (2016) « Chemometric analysis of bacterial peptidoglycan reveals atypical modifications that empower the cell wall against predatory enzymes and fly innate immunity », *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 138(29), pp. 9193–9204.

Espéli, O. et al. (2012) 'A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*', *EMBO Journal*, 31(14), pp. 3198–3211.

Espéli, O., Lee, C. and Marians, K. J. (2003) 'A Physical and Functional Interaction between *Escherichia coli* *FtsK* and Topoisomerase IV', *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), pp. 44639–44644.

Fang, X. et al. (2006) 'The mechanism of action of ramoplanin and enduracidin', *Mol. BioSyst.*, 2(1), pp. 69–76.

Farha, M. A. et al. (2015) « Antagonism screen for inhibitors of bacterial cell wall biogenesis uncovers an inhibitor of undécaprényl diphosphate synthase », *PNAS*, 112(35), pp. 11048–11053.

Fay, A., Meyer, P. and Dworkin, J. (2010) 'Interactions Between Late-Acting Proteins Required for Peptidoglycan Synthesis during Sporulation', *Journal of Molecular Biology*, 399(4), pp. 547–561

Fenton, A. K. and Gerdes, K. (2013) 'Direct interaction of *FtsZ* and MreB is required for septum synthesis and cell division in *Escherichia coli*', *The EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 32(13), pp. 1953–1965.

Fenton, A. K. et al. (2016) « CozE is a member of the MreCD complex that directs cell elongation in *Streptococcus pneumoniae* », *Nature microbiology*, 2, p. 16237.

Figueiredo, T. A. et al. (2012) « Identification of genetic determinants and enzymes involved with the amidation of glutamic acid residues in the peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* », *PLOS Pathogens*. Public Library of Science, 8(1), p. e1002508.

Filipe, S. R. and Tomasz, A. (2000) 'Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall muropeptide branching genes', *PNAS*, 97(9), p. 4891 LP-4896.

- Finn, R. D. et al. (2014) « Pfam: the protein families database », *Nucleic Acids Research*, 42(D1), pp. D222–D230.
- Firczuk, M. and Bochtler, M. (2007) ‘Folds and activities of peptidoglycan amidases’, *FEMS Microbiology Reviews*, 31(6), pp. 676–691.
- Fischer, W., Rösel, P. and Koch, H. U. (1981) ‘Effect of alanine ester substitution and other structural features of lipoteichoic acids on their inhibitory activity against autolysins of *Staphylococcus aureus*’, *Journal of bacteriology*, 146(2), pp. 467–475.
- Fiuza, M. et al. (2010) « Phosphorylation of a Novel Cytoskeletal Protein (RsmP) Regulates Rod-shaped Morphology in *Corynebacterium* », *The Journal of biological chemistry*, 285(38), pp. 29387–29397.
- Flärdh, K. (2003) ‘Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor A3(2)'*, *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 49(6), pp. 1523–1536.
- Fletcher, S. et al. (2015) « Structure-activity exploration of a small-molecule Lipid II inhibitor », *Drug design, development and therapy*. Dove Medical Press, 9, pp. 2383–2394.
- Fleurie, A. et al. (2014) « Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division », *PLoS genetics*. Public Library of Science, 10(4), pp. e1004275–e1004275.
- Frapont, C. et al. (2011) ‘The integral membrane *FtsW* protein and peptidoglycan synthase PBP3 form a subcomplex in *Escherichia coli*’, *Microbiology*, 157(1), pp. 251–259.
- Frère, J.-M., Sauvage, E. and Kerff, F. (2016) ‘From “An Enzyme Able to Destroy Penicillin” to Carbapenemases: 70 Years of Beta-lactamase Misbehaviour’, *Current Drug Targets*, 17(9), pp. 974–982.
- Fröjd, M. J. and Flärdh, K. (2019) ‘Apical assemblies of intermediate filament-like protein FilP are highly dynamic and affect polar growth determinant DivIVA in *Streptomyces venezuelae*’, *Molecular Microbiology*, 112(1), pp. 47–61.
- Fuchino, K. et al. (2013) « Dynamic gradients of an intermediate filament-like cytoskeleton are recruited by a polarity landmark during apical growth », *PNAS*, 110(21), pp. 1889–1897.
- Fujita, J. et al. (2014) « Crystal structure of *FtsA* from *Staphylococcus aureus* », *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 588(10), pp. 1879–1885.
- Fukushima, T. et al. (2007) « Characterization of new I,d-endopeptidase gene product CwlK (previous YcdD) that hydrolyzes peptidoglycan in *Bacillus subtilis* », *Molecular Genetics and Genomics*, 278(4), pp. 371–383.
- Fuse, S. et al. (2010) « Functional and Structural Analysis of a Key Region of the Cell Wall Inhibitor Moenomycin », *ACS Chemical Biology*, 5(7), pp. 701–711.
- Gallant, C. V. et al. (2005) « Common β-lactamases inhibit bacterial biofilm formation », *Molecular Microbiology*, 58(4), pp. 1012–1024.
- Galli, E. and Gerdes, K. (2010) ‘Spatial resolution of two bacterial cell division proteins: ZapA recruits ZapB to the inner face of the Z-ring’, *Molecular Microbiology*, 76(6), pp. 1514–1526.
- Galli, E. and Gerdes, K. (2012) ‘*FtsZ*-ZapA-ZapB interactome of *Escherichia coli*’, *Journal of Bacteriology*, 194(2), pp. 292–302.
- García del Portillo, F. and de Pedro, M. A. (1990) « Differential effect of mutational impairment of penicillin-binding proteins 1A and 1B on *Escherichia coli* strains harboring thermosensitive mutations in the cell division genes *ftsA*, *ftsQ*, *ftsZ*, and *pbpB* », *Journal of Bacteriology*, 172(10), pp. 5863–5870.
- Garcia, P. et al. (1999) « The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains », *Molecular Microbiology*, 33(1), pp. 128–138.
- Garner, E. C. et al. (2011) ‘Coupled, Circumferential Motions of the Cell Wall Synthesis Machinery and MreB Filaments in *B. subtilis*’, *Science*, 333(6039), pp. 222 LP – 225.
- Geissler, B. and Margolin, W. (2005) ‘Evidence for functional overlap among multiple bacterial cell division proteins: compensating for the loss of *FtsK*’, *Molecular Microbiology*, 58(2), pp. 596–612.

- Gerding, M. A. et al. (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* », *Molecular Microbiology*, 63(4), pp. 1008–1025.
- Gerding, M. A. et al. (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 », *Journal of Bacteriology*, 191(24), pp. 7383–7401.
- Germon, P. et al. (1998) « Mutational analysis of the *Escherichia coli* K-12 TolA N-terminal region and characterization of its TolQ-interacting domain by genetic suppression », *Journal of bacteriology*, 180(24), pp. 6433–6439.
- Germon, P. et al. (2001) « Energy-Dependent Conformational Change in the TolA Protein of *Escherichia coli* Involves Its N-Terminal Domain, TolQ, and TolR », *Journal of Bacteriology*, 183(14), pp. 4110–4114.
- Gharawi, R. J., Neuner, E. and Rehm, S. J. (2015) 'Ceftaroline fosamil: A super-cephalosporin?', *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 82(7), pp. 437–444.
- Ghuysen, J. M. (1991) 'Serine Beta-Lactamases and Penicillin-Binding Proteins', *Annual Review of Microbiology*, 45(1), pp. 37–67.
- Gibson, C. W., Daneo-Moore, L. and Higgins, M. L. (1983) 'Cell wall assembly during inhibition of DNA synthesis in *Streptococcus faecium*', *Journal of bacteriology*, 155(1), pp. 351–356.
- Glas, M. et al. (2015) 'The soluble periplasmic domains of *Escherichia coli* cell division proteins *FtsQ/FtsB/FtsL* form a trimeric complex with submicromolar affinity', *Journal of Biological Chemistry*, 290(35), pp. 21498–21509.
- Goehring, N. W. et al. (2007) 'Mutants, Suppressors, and Wrinkled Colonies: Mutant Alleles of the Cell Division Gene *ftsQ* Point to Functional Domains in *FtsQ* and a Role for Domain 1C of *FtsA* in Divisome Assembly', *Journal of Bacteriology*, 189(2), pp. 633–645.
- Goehring, N. W., Gonzalez, M. D. and Beckwith, J. (2006) 'Premature targeting of cell division proteins to midcell reveals hierarchies of protein interactions involved in divisome assembly', *Molecular Microbiology*, 61(1), pp. 33–45.
- Goemaere, E. L., Cascales, E. and Lloubès, R. (2007) 'Mutational Analyses Define Helix Organization and Key Residues of a Bacterial Membrane Energy-transducing Complex', *Journal of Molecular Biology*, 366(5), pp. 1424–1436.
- Goffin, C. and Ghuysen, J. M. (1998) 'Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs', *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. American Society for Microbiology, 62(4), pp. 1079–1093.
- Gonzalez, M. D. and Beckwith, J. (2009) 'Divisome under construction: Distinct domains of the small membrane protein *ftsB* are necessary for interaction with multiple cell division proteins', *Journal of Bacteriology*, 191(8), pp. 2815–2825.
- Gonzalez, M. D. et al. (2010) 'Multiple interaction domains in *FtsL*, a protein component of the widely conserved bacterial *FtsLBQ* cell division complex', *Journal of Bacteriology*, 192(11), pp. 2757–2768.
- González-Leiza, S. M., de Pedro, M. A. and Ayala, J. A. (2011) 'AmpH, a bifunctional dd-endopeptidase and dd-Carboxypeptidase of *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 193(24), p. 6887 LP-6894.
- Goodell, E. W. (1985) 'Recycling of murein by *Escherichia coli*', *Journal of bacteriology*, 163(1), pp. 305–310.
- Grainge, I. (2013) 'Simple topology: *FtsK*-directed recombination at the *dif* site', *Biochemical Society Transactions*, 41(2), pp. 595–600.
- Grangeon, R. et al. (2015) 'PopZ identifies the new pole, and PodJ identifies the old pole during polar growth in *Agrobacterium tumefaciens*', *PNAS*, 112(37), pp. 11,666–71.
- Gray, A. N. et al. (2015) 'Coordination of peptidoglycan synthesis and outer membrane constriction during *Escherichia coli* cell division', *eLife*, 4, pp. 1–29.
- Greene, N. G., Fumeaux, C. and Bernhardt, T. G. (2018) 'Conserved mechanism of cell-wall synthase regulation revealed by the identification of a new PBP activator in *Pseudomonas aeruginosa*', *PNAS*, 115(12), pp. 3150–3155.
- Greene, N. P. et al. (2018) 'Antibiotic Resistance Mediated by the MacB ABC Transporter Family: A Structural and Functional Perspective', *Frontiers in Microbiology*, 9.

- Greenwood, D., Bidgood, K. and Turner, M. (1987) 'A comparison of the responses of staphylococci and streptococci to teicoplanin and vancomycin', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 20(2), pp. 155–164.
- Grein, F. et al. (2020) « Ca²⁺-Daptomycin targets cell wall biosynthesis by forming a tripartite complex with undécaprényl coupled intermediates and membrane lipids », *Nature Communications*. Springer US, 11(1), p. 1455.
- Grein, F., Schneider, T. and Sahl, H. G. (2019) 'Docking on Lipid II—A Widespread Mechanism for Potent Bactericidal Activities of Antibiotic Peptides', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 431(18), pp. 3520–3530.
- Grenga L, Luzi G, Paolozzi L, G. P. (2008) 'The Escherichia coli *FtsK* functional domains involved in its interaction with its divisome protein partners', *FEMS Microbiology Letters*, 287(2), pp. 163–167.
- Guo, R.-T. et al. (2007) 'Bisphosphonates target multiple sites in both cis- and trans-prenyltransferases', *PNAS*, 104(24), pp. 10022–10027.
- Gupta, A. et al. (2016) 'Novel 4-Thiazolidinone Derivatives as Anti-Infective Agents: Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Evaluation', *Biochemistry Research International*, 2016, pp. 1–8.
- Ha, R. et al. (2016) 'Accumulation of peptidoglycan O-acetylation leads to altered cell wall biochemistry and negatively impacts pathogenesis factors of *Campylobacter jejuni*', *Journal of Biological Chemistry*, 291(43), pp. 22686–22702.
- Hagras, M. et al. (2018) « Biphenylthiazole antibiotics with an oxadiazole linker: An approach to improve physicochemical properties and oral bioavailability »,
- Hale, C. A. et al. (2011) 'Identification of Escherichia Coli ZapC (YcbW) as a Component of the Division Apparatus That Binds and Bundles *FtsZ* Polymers', *Journal of Bacteriology*, 193(6), pp. 1393 LP – 1404.
- Hale, C. A., Rhee, A. C. and de Boer, P. A. J. (2000) 'ZipA-Induced Bundling of *FtsZ* Polymers Mediated by an Interaction between C-Terminal Domains', *Journal of Bacteriology*, 182(18), pp. 5153–5166.
- Hammond, L. R., White, M. L. and Eswara, J. (2019) 'iVIVA la DivIVA!', *Journal of bacteriology*, 201(21), pp. e00245-19.
- Hara, H. and Suzuki, H. (1984) 'A novel glycan polymerase that synthesizes uncross-linked peptidoglycan in Escherichia coli', *FEBS Letters*, 168(1), pp. 155–160.
- Hardt, P. et al. (2017) 'The cell wall precursor lipid II acts as a molecular signal for the Ser/Thr kinase PknB of *Staphylococcus aureus*', *International Journal of Medical Microbiology*, 307(1), pp. 1–10.
- Harris, F. et al. (2002) 'Investigations into the mechanisms used by the C-terminal anchors of Escherichia coli penicillin-binding proteins 4, 5, 6 and 6b for membrane interaction', *European Journal of Biochemistry*, 269(23), pp. 5821–5829.
- Hart, P. et al. (2016) 'New Insights into Nisin's Antibacterial Mechanism Revealed by Binding Studies with Synthetic Lipid II Analogues', *Biochemistry*, 55(1), pp. 232–237.
- Hashizume, H. et al. (2011) 'Tripropeptin C Blocks the Lipid Cycle of Cell Wall Biosynthesis by Complex Formation with Undécaprényl Pyrophosphate', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(8), pp. 3821–3828.
- Hayashi, I., Oyama, T. and Morikawa, K. (2001) 'Structural and functional studies of MinD ATPase: implications for the molecular recognition of the bacterial cell division apparatus', *The EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 20(8), pp. 1819–1828.
- Heidrich, C. et al. (2001) 'Involvement of N-acetylmuramyl-l-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of Escherichia coli', *Molecular Microbiology*, 41(1), pp. 167–178.
- Heinrich, P. et al. (1987) 'The molecular organization of the lysostaphin gene and its sequences repeated in tandem', *Molecular and General Genetics MGG*, 209(3), pp. 563–569.
- Hempel, A. M. et al. (2008) 'Assemblies of DivIVA Mark Sites for Hyphal Branching and Can Establish New Zones of Cell Wall Growth in Streptomyces coelicolor', *Journal of Bacteriology*, 190(22), pp. 7579 LP – 7583.
- Hempel, A. M. et al. (2012) 'The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria Streptomyces', *PNAS*, 109(35), pp. 2371-2379.

- Henderson, T. A., Dombrosky, P. M. and Young, K. D. (1994) 'Artifactual processing of penicillin-binding proteins 7 and 1b by the OmpT protease of *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 176(1), pp. 256–259.
- Hernández-Rocamora, V. M. et al. (2018) 'Coupling of polymerase and carrier lipid phosphatase prevents product inhibition in peptidoglycan synthesis', *Cell Surface*. Elsevier, 2(March), pp. 1–13.
- Herricks, J. R., Nguyen, D. and Margolin, W. (2014) 'A thermosensitive defect in the ATP binding pocket of *FtsA* can be suppressed by allosteric changes in the dimer interface', *Molecular Microbiology*, 94(3), pp. 713–727.
- Higgins, M. L. and Shockman, G. D. (1976) 'Study of cycle of cell wall assembly in *Streptococcus faecalis* by three-dimensional reconstructions of thin sections of cells.', *Journal of Bacteriology*, 127(3), pp. 1346 LP – 1358.
- Holmes, N. A. et al. (2013) 'Coiled-coil protein Scy is a key component of a multiprotein assembly controlling polarized growth in *Streptomyces*', *PNAS*, 110(5), pp. 397–406.
- Höltje, J. (1998) 'Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*', *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 62(1), pp. 181–203.
- Holtje, J. V and Tomasz, A. (1975) 'Biological effects of lipoteichoic acids', *Journal of bacteriology*, 124(2), pp. 1023–1027.
- Holtje, J. V et al. (1975) 'Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*', *Journal of bacteriology*, 124(3), pp. 1067–1076.
- 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*', *Journal of General Microbiology*, 137(3), pp. 441–454.
- Höltje, J.-V. et al. (1994) « The negative regulator of β^2 -lactamase induction AmpD is a N-acetyl-anhydromuramyl-L-alanine amidase », *FEMS Microbiology Letters*, 122(1–2), pp. 159–164.
- Horsburgh, G. J., Atrih, A. and Foster, S. J. (2003) 'Characterization of LytH, a Differentiation-Associated Peptidoglycan Hydrolase of *Bacillus subtilis* Involved in Endospore Cortex Maturation', *Journal of Bacteriology*, 185(13), pp. 3813–3820.
- Horvath, D. J. et al. (2011) « Morphological plasticity promotes resistance to phagocyte killing of uropathogenic *Escherichia coli* », *Microbes and Infection*. Elsevier Masson SAS, 13(5), pp. 426–437.
- Howard, N. I. and Bugg, T. D. . (2003) 'Synthesis and activity of 5'-Uridinyl dipeptide analogues mimicking the amino terminal peptide chain of nucleoside antibiotic mureidomycin A', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11(14), pp. 3083–3099.
- Howell, M. and Brown, P. J. (2016) 'Building the bacterial cell wall at the pole', *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 34, pp. 53–59.
- Howell, M. et al. (2019) 'Agrobacterium tumefaciens divisome proteins regulate the transition from polar growth to cell division', *Molecular Microbiology*, 111(4), pp. 1074–1092.
- Hsu, C.-H. et al. (2014) 'Iminosugar C-Glycoside Analogues of α -d-GlcNAc-1-Phosphate: Synthesis and Bacterial Transglycosylase Inhibition', *The Journal of Organic Chemistry*, 79(18), pp. 8629–8637.
- Hsu, S.-T. D. et al. (2003) 'NMR Study of Mersacidin and Lipid II Interaction in Dodecylphosphocholine Micelles', *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), pp. 13110–13117.
- Hu, Y. et al. (2004) 'Identification of Selective Inhibitors for the Glycosyltransferase MurG via High-Throughput Screening', *Chemistry & Biology*, 11(5), pp. 703–711.
- Hu, Z. and Lutkenhaus, J. (1999) 'Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE', *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 34(1), pp. 82–90.
- Hu, Z. and Lutkenhaus, J. (2000) 'Analysis of MinC Reveals Two Independent Domains Involved in Interaction with MinD and *FtsZ*', *Journal of Bacteriology*, 182(14), pp. 3965 LP – 3971.
- Hu, Z. and Lutkenhaus, J. (2001) 'Topological Regulation of Cell Division in *E. coli* : Spatiotemporal Oscillation of MinD Requires Stimulation of Its ATPase by MinE and Phospholipid', *Molecular Cell*. Elsevier, 7(6), pp. 1337–1343.

- Hu, Z., Saez, C. and Lutkenhaus, J. (2003) 'Recruitment of MinC, an Inhibitor of Z-Ring Formation, to the Membrane in Escherichia coli : Role of MinD and MinE', *Journal of Bacteriology*, 185(1), pp. 196 LP – 203.
- Huang, K. H. et al. (2016) 'Characterization of the *FtsZ* C-Terminal variable (CTV) Region in Z-Ring assembly and interaction with the Z-Ring stabilizer ZapD in E. coli cytokinesis', *PLoS ONE*, 11(4), pp. 1–24.
- Huang, K.-H., Durand-Heredia, J. and Janakiraman, A. (2013) 'FtsZ Ring Stability: of Bundles, Tubules, Crosslinks, and Curves', *Journal of Bacteriology*, 195(9), pp. 1859 LP – 1868.
- Huang, S.-H. et al. (2013) 'New Continuous Fluorometric Assay for Bacterial Transglycosylase Using Förster Resonance Energy Transfer', *Journal of the American Chemical Society*, 135(45), pp. 17078–17089.
- Huecas, S. and Andreu, J. M. (2004) 'Polymerization of nucleotide-free, GDP- and GTP-bound cell division protein *FtsZ*: GDP makes the difference', *FEBS Letters*, 569(1–3), pp. 43–48.
- Huecas, S. et al. (2007) « The Interactions of Cell Division Protein *FtsZ* with Guanine Nucleotides », *Journal of Biological Chemistry*, 282(52), pp. 37515–37528.
- Hughes, H. V. et al. (2010) « Protein localization and dynamics within a bacterial organelle », *PNAS*, 107(12), pp. 5599–5604.
- Hughes, H. V. et al. (2013) « Co-ordinate synthesis and protein localization in a bacterial organelle by the action of a penicillin-binding protein », *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 90(6), pp. 1162–1177.
- Hughes, R. C., Thurman, P. F. and Stokes, E. (1975) 'Estimates of the porosity of Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis cell walls.', *Zeitschrift für Immunitätsforschung, experimentelle und klinische Immunologie*. Germany, 149(2–4), pp. 126–135.
- Hussain, S. et al. (2018) « MreB filaments align along greatest principal membrane curvature to orient cell wall synthesis », *eLife*. eLife Sciences Publications, Ltd, 7, p. e32471.
- Hvorup, R. N. et al. (2003) « The multidrug / oligosaccharidyl-lipid / polysaccharide (MOP) exporter superfamily », *Eur. J. Biochem*, 813, pp. 799–813.
- Ikebe, R. et al. (2018) 'The periplasmic disordered domain of RodZ promotes its self-interaction in Escherichia coli', *Genes to Cells*, 23(4), pp. 307–317.
- Ingerson-Mahar, M. et al. (2010) 'The metabolic enzyme CTP synthase forms cytoskeletal filaments', *Nature cell biology*. 2010/07/18, 12(8), pp. 739–746.
- Inoue, A. et al. (2008) 'Involvement of an essential gene, mviN, in murein synthesis in Escherichia coli', *Journal of bacteriology*, 190(21), pp. 7298–7301.
- Ize, B. et al. (2003) 'Role of the Escherichia coli Tat pathway in outer membrane integrity', *Molecular Microbiology*, 48(5), pp. 1183–1193.
- Jacobs, C. et al. (1995) 'AmpD, essential for both β -lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase', *Molecular Microbiology*, 15(3), pp. 553–559.
- Jean, N. L. et al. (2014) 'Elongated Structure of the Outer-Membrane Activator of Peptidoglycan Synthesis LpoA: Implications for PBP1A Stimulation', *Structure*, 22(7), pp. 1047–1054.
- Jiang, C., Caccamo, P. D. and Brun, Y. V (2015) 'Mechanisms of bacterial morphogenesis: Evolutionary cell biology approaches provide new insights', *BioEssays*, 37(4), pp. 413–425.
- Jorgenson, M. A. et al. (2014) 'The bacterial septal ring protein RlpA is a lytic transglycosylase that contributes to rod shape and daughter cell separation in *Pseudomonas aeruginosa*', *Molecular Microbiology*, 93(1), pp. 113–128.
- Journet, L. et al. (1999) « Role of TolR N-terminal, central, and C-terminal domains in dimerization and interaction with TolA and tolQ », *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 181(15), pp. 4476–4484.

- Jukic, M. et al. (2019) 'Anthranilic acid inhibitors of Undécaprényl Pyrophosphate Synthase (UppS), an essential enzyme for bacterial cell wall biosynthesis', *Frontiers in Microbiology*, 10(JAN), pp. 1–9.
- Kabsch, W. (2010) 'XDS', *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66(2), pp. 125–132.
- Kang, C. et al. (2005) 'The *Mycobacterium tuberculosis*
- Karamanos, Y. (1997) 'Endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidases and their potential substrates : structure/function relationships', *Research in Microbiology*, 148(8), pp. 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', *Journal of Bacteriology*, 187(7), pp. 2233–2243.
- Kato, J., Suzuki, H. and Hirota, Y. (1984) 'Overlapping of the coding regions for α and γ components of penicillin-binding protein 1 b in *Escherichia coli*', *Molecular and General Genetics MGG*, 196(3), pp. 449–457.
- Kato, J., Suzuki, H. and Hirota, Y. (1985) 'Dispensability of either penicillin-binding protein -1a or -1b involved in the essential process for cell elongation in *Escherichia coli*', *Molecular and General Genetics MGG*, 200(2), pp. 272–277.
- Kawazura, T. et al. (2017) « Exclusion of assembled MreB by anionic phospholipids at cell poles confers cell polarity for bidirectional growth », *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 104(3), pp. 472–486.
- Keller, A. N. et al. (2016) « Activation of Xer-recombination at dif: Structural basis of the *FtsKy*-XerD interaction », *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(August), pp. 1–12.
- Kelly, J. A. et al. (1992) « Crystalline enzyme kinetics: activity of the *Streptomyces R61* d-alanyl-d-alanine peptidase », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1119(3), pp. 256–260.
- Kim, H. S. et al. (2015) 'The Cell Shape-determining Csd6 Protein from *Helicobacter pylori* Constitutes a New Family of L,D-Carboxypeptidase', *The Journal of biological chemistry*, 290(41), pp. 25103–25117.
- Kim, S. Y. et al. (2006) 'Single molecules of the bacterial actin MreB undergo directed treadmilling motion in *Caulobacter crescentus*', *PNAS*, 103(29), pp. 10929–10934.
- Kim, S., Pires, M. M. and Im, W. (2018) 'Insight into Elongation Stages of Peptidoglycan Processing in Bacterial Cytoplasmic Membranes', *Scientific Reports*, 8(1), p. 17704.
- King, D. T. et al. (2017) 'Structural insights into inhibition of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1B', *Journal of Biological Chemistry*, 292(3), pp. 979–993.
- King, D. T., Lameignere, E. and Strynadka, N. C. J. (2014) 'Structural insights into the lipoprotein outer membrane regulator of penicillin-binding protein 1B', *Journal of Biological Chemistry*, 289(27), pp. 19245–19253.
- King, G. F. et al. (2000) 'Structural basis for the topological specificity function of MinE', *Nature Structural Biology*, 7(11), pp. 1013–1017.
- Kiran, M. et al. (2009) 'Mycobacterium tuberculosis ftsH expression in response to stress and viability', *Tuberculosis*, 89, pp. S70–S73.
- Korza, H. J. and Bochtler, M. (2005) 'Pseudomonas aeruginosa LD-Carboxypeptidase, a Serine Peptidase with a Ser-His-Glu Triad and a Nucleophilic Elbow', *Journal of Biological Chemistry*, 280(49), pp. 40802–40812.
- Kraft, A. R., Templin, M. F. and Höltje, J. V (1998) 'Membrane-bound lytic endotransglycosylase in *Escherichia coli*', *Journal of bacteriology*, 180(13), pp. 3441–3447.
- Krieger, E. and Vriend, G. (2014) 'YASARA View—molecular graphics for all devices—from smartphones to workstations', *Bioinformatics*, 30(20), pp. 2981–2982.
- Krupka, M. and Margolin, W. (2018) 'Unite to divide: Oligomerization of tubulin and actin homologs regulates initiation of bacterial cell division', *F1000Research*. F1000 Research Limited, 7, p. 235.
- Krupka, M. et al. (2012) 'Key role of two terminal domains in the bidirectional polymerization of *FtsA* protein', *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), pp. 7756–7765.

- Krupka, M. et al. (2014) 'Role of the *FtsA* C terminus as a switch for polymerization and membrane association', *mBio*, 5(6), pp. 1–9.
- Krupka, M. et al. (2017) « *Escherichia coli FtsA* forms lipid-bound minirings that antagonize lateral interactions between *FtsZ* protofilaments », *Nature communications*. Nature Publishing Group, 8, p. 15,957.
- Krupka, M. et al. (2018) 'Escherichia coli ZipA Organizes *FtsZ* Polymers into Dynamic Ring-Like Protofilament Structures', *mBio*, 9(3), pp. e01008-18.
- Kruse, T., Bork-Jensen, J. and Gerdes, K. (2005) 'The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex', *Molecular Microbiology*, 55(1), pp. 78–89.
- Kühn, J. et al. (2010) « Bactofilins, a ubiquitous class of cytoskeletal proteins mediating polar localization of a cell wall synthase in *Caulobacter crescentus* », *The EMBO Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 29(2), pp. 327–339.
- Kuk, A. C. Y. et al. (2019) 'Visualizing conformation transitions of the Lipid II flippase MurJ', *Nature Communications*, 10(1), p. 1736.
- Kuk, A. C. Y., Mashalidis, E. H. and Lee, S.-Y. (2017) 'Crystal structure of the MOP flippase MurJ in an inward-facing conformation', *Nature structural & molecular biology*. 2016/12/26, 24(2), pp. 171–176.
- Kumar, S. et al. (2019) 'The bacterial lipid II flippase MurJ functions by an alternating-access mechanism', *Journal of Biological Chemistry*, 294, pp. 981–990.
- Kureisaite-Ciziene, D. et al. (2018) 'Structural Analysis of the Interaction between the Bacterial Cell Division Proteins *FtsQ* and *FtsB*', *mBio*, 9(5), pp. 1–17.
- Kurita, K. et al. (2019) « Relation between rotation of MreB actin and cell width of *Escherichia coli* », *Genes to Cells*, 24(3), pp. 259–265.
- Lackner, L. L., Raskin, D. M. and de Boer, P. A. J. (2003) 'ATP-Dependent Interactions between *Escherichia coli* Min Proteins and the Phospholipid Membrane In Vitro', *Journal of Bacteriology*, 185(3), pp. 735 LP – 749.
- Lam, H., Schofield, W. B. and Jacobs-Wagner, C. (2006) 'A Landmark Protein Essential for Establishing and Perpetuating the Polarity of a Bacterial Cell', *Cell*, 124(5), pp. 1011–1023.
- Land, A. D. and Winkler, M. E. (2011) 'The Requirement for Pneumococcal MreC and MreD Is Relieved by Inactivation of the Gene Encoding PBP1a', 193(16), pp. 4166–4179.
- Landman, D. et al. (2014) 'In vitro activity of the siderophore monosulfactam BAL30072 against contemporary Gram-negative pathogens from New York City, including multidrug-resistant isolates', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(6), pp. 527–532.
- LaPointe, L. M. et al. (2013) 'Structural Organization of *FtsB*, a Transmembrane Protein of the Bacterial Divisome', *Biochemistry*, 52(15), pp. 2574–2585.
- Lara, B. and Ayala, J. A. (2002) 'Topological characterization of the essential *Escherichia coli* cell division protein *FtsW*', *FEMS Microbiology Letters*, 216(1), pp. 23–32.
- Lara, B. et al. (2005) 'Cell division in cocci: Localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae FtsA* protein', *Molecular Microbiology*, 55(3), pp. 699–711.
- Lavollay, M. et al. (2008) 'The Peptidoglycan of Stationary-Phase *Mycobacterium tuberculosis* Predominantly Contains Cross-Links Generated by L,D-Transpeptidation', *Journal of Bacteriology*, 190(12), pp. 4360–4366.
- Lazzaroni, J. C. et al. (1995) 'Transmembrane α -Helix Interactions are Required for the Functional Assembly of the *Escherichia coli* Tol Complex', *Journal of Molecular Biology*, 246(1), pp. 1–7.
- Leadbetter, M. R. et al. (2004) 'Hydrophobic Vancomycin Derivatives with Improved ADME Properties: Discovery of Telavancin (TD-6424)', *The Journal of Antibiotics*, 57(5), pp. 326–336.
- Leaver, M. and Errington, J. (2005) 'Roles for MreC and MreD proteins in helical growth of the cylindrical cell wall in *Bacillus subtilis*', *Molecular Microbiology*, 57(5), pp. 1196–1209.

- Leclercq, S. et al. (2017) 'Interplay between Penicillin-binding proteins and SEDS proteins promotes bacterial cell wall synthesis', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1-13.
- Lee, J. Y. et al. (2014) 'Single-Molecule Imaging of *FtsK* Translocation Reveals Mechanistic Features of Protein-Protein Collisions on DNA', *Molecular Cell*, 54(5), pp. 832–843.
- Lee, S. C. et al. (2019) « Nano-encapsulated Escherichia coli Divisome Anchor ZipA, and in Complex with *FtsZ* », *Scientific Reports*. Springer US, 9(1), pp. 1–16.
- Lee, T. K. et al. (2014) 'A dynamically assembled cell wall synthesis machinery buffers cell growth', *PNAS*, 111(12), pp. 4554–4559.
- Lesterlin, C. et al. (2008) 'Asymmetry of Chromosome Replicores Renders the DNA Translocase Activity of *FtsK* Essential for Cell Division and Cell Shape Maintenance in Escherichia coli', *PLoS Genetics*, 4(12), p. e1000288.
- Levefaudes, M. et al. (2015) « Diaminopimelic Acid Amidation in Corynebacteriales: new insights into the role of LtsA in peptidoglycan modification », *The Journal of biological chemistry*. 2015/04/06. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 290(21), pp. 13079–13094.
- Levengood, S. K., Beyer, W. F. and Webster, R. E. (1991) 'TolA: a membrane protein involved in colicin uptake contains an extended helical region.', *PNAS*, 88(14), pp. 5939–5943.
- Li, Z. et al. (2007) « The structure of *FtsZ* filaments *in vivo* suggests a force-generating role in cell division », *The EMBO journal*. 2007/10/18. Nature Publishing Group, 26(22), pp. 4694–4708.
- Liechti, G. et al. (2016) 'Pathogenic Chlamydia Lack a Classical Sacculus but Synthesize a Narrow, Mid-cell Peptidoglycan Ring, Regulated by MreB, for Cell Division', *PLOS Pathogens*, 12(5), p. e1005590.
- Liechti, G. W. et al. (2014) « A new metabolic cell-wall labelling method reveals peptidoglycan in Chlamydia trachomatis », *Nature*. 2013/12/11, 506(7489), pp. 507–510.
- Ling, L. L. et al. (2015) 'A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance', *Nature*, 517(7535), pp. 455–459.
- Liu et al. (2019) 'MreC and MreD balance the interaction between the elongasome 2 proteins PBP2 and RodA', *bioRxiv*.
- Liu, B. et al. (2015) « Roles for both *FtsA* and the *FtsBLQ* subcomplex in *FtsN*-stimulated cell constriction in Escherichia coli », *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 95(6), pp. 945–970.
- Liu, B. et al. (2019) « Roles of the DedD Protein in Escherichia coli cell constriction », *Journal of Bacteriology*, 201(8), pp. 1–20.
- Liu, G., Draper, G. C. and Donachie, W. D. (1998) 'FtsK is a bifunctional protein involved in cell division and chromosome localization in Escherichia coli', *Molecular Microbiology*, 29(3), pp. 893–903.
- Liu, X. et al. (2018) 'FtsW activity and lipid II synthesis are required for recruitment of MurJ to midcell during cell division in Escherichia coli', *Molecular Microbiology*, 109(6), pp. 855–884.
- Liu, Y. and Breukink, E. (2016) 'The membrane steps of bacterial cell wall synthesis as antibiotic targets', *Antibiotics*, 5(3).
- Liu, Y. et al. (2016) 'New insight into the catalytic mechanism of bacterial MraY from enzyme kinetics and docking studies', *Journal of Biological Chemistry*, 291(29), pp. 15057–15068.
- Lleo, M. M., Canepari, P. and Satta, G. (1990) 'Bacterial cell shape regulation: testing of additional predictions unique to the two-competing-sites model for peptidoglycan assembly and isolation of conditional rod-shaped mutants from some wild-type cocci', *Journal of bacteriology*, 172(7), pp. 3758–3771.
- Lo Sciuto, A. et al. (2014) 'The Periplasmic Protein TolB as a Potential Drug Target in *Pseudomonas aeruginosa*', *PLoS ONE*, 9(8), p. e103784.
- Loessner, M. J. (2005) 'Bacteriophage endolysins — current state of research and applications', *Current Opinion in Microbiology*, 8(4), pp. 480–487.

- Loose, M. and Mitchison, T. J. (2014) 'The bacterial cell division proteins *FtsA* and *FtsZ* self-organize into dynamic cytoskeletal patterns', *Nature cell biology*. 2013/12/08, 16(1), pp. 38–46.
- Loose, M. et al. (2011) « Min protein patterns emerge from rapid rebinding and membrane interaction of MinE », *Nature Structural and Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 18(5),
- López-Montero, I. et al. (2013) 'Intrinsic disorder of the bacterial cell division protein ZipA: coil-to-brush conformational transition', *The FASEB Journal*, 27(8), pp. 3363–3375.
- losis serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape.', *Genes & Developpement*, 19(14), pp. 1692–1704.
- Lovering, A. L. and Strynadka, N. C. J. (2007) 'High-resolution Structure of the Major Periplasmic Domain from the Cell Shape-determining Filament MreC', *Journal of Molecular Biology*, 372(4), pp. 1034–1044..
- Lovering, A. L. et al. (2007) 'Structural insight into the transglycosylation step of bacterial cell-wall biosynthesis', *Science*, 315(5817), pp. 1402–1405.
- Lovering, A. L., De Castro, L. and Strynadka, N. C. J. (2008) 'Identification of Dynamic Structural Motifs Involved in Peptidoglycan Glycosyltransfer', *Journal of Molecular Biology*, 383(1), pp. 167–177.
- Low, H. H., Moncrieffe, M. C. and Löwe, J. (2004) 'The Crystal Structure of ZapA and its Modulation of *FtsZ* Polymerisation', *Journal of Molecular Biology*, 341(3), pp. 839–852.
- Löwe, J. et al. (2008) 'Molecular Mechanism of Sequence-Directed DNA Loading and Translocation by *FtsK*', *Molecular Cell*, 31(4), pp. 498–509.
- Lupoli, T. J. et al. (2014) 'Lipoprotein Activators Stimulate Escherichia coli Penicillin-Binding Proteins by Different Mechanisms', *Journal of the American Chemical Society*, 136(1), pp. 52–55.
- Lutkenhaus, J. (2009) 'FtsN—Trigger for Septation', *Journal of Bacteriology*, 191(24), pp. 7381–7382.
- Lutkenhaus, J., Pichoff, S. and Du, S. (2012) 'Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome', *Cytoskeleton*. John Wiley & Sons, Ltd, 69(10), pp. 778–790.
- Lyngstadaas, A., Løbner-Olesen, A. and Boye, E. (1995) 'Characterization of three genes in the dam-containing operon of Escherichia coli', *Molecular and General Genetics MGG*, 247(5), pp. 546–554.
- Ma, L., King, G. F. and Rothfield, L. (2004) 'Positioning of the MinE binding site on the MinD surface suggests a plausible mechanism for activation of the Escherichia coli MinD ATPase during division site selection', *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 54(1), pp. 99–108.
- Ma, L.-Y., King, G. and Rothfield, L. (2003) 'Mapping the MinE Site Involved in Interaction with the MinD Division Site Selection Protein of Escherichia coli', *Journal of Bacteriology*, 185(16), pp. 4948 LP – 4955.
- Maggi, S. et al. (2008) 'Division protein interaction web: identification of a phylogenetically conserved common interactome between *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli*', *Microbiology*, 154(10), pp. 3042–3052.
- Mahapatra, S., Crick, D. C. and Brennan, P. J. (2000) 'Comparison of the UDP- N -acetylmuramate : L -alanine ligase enzymes from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*', *Journal of bacteriology*, 182(23), pp. 6827–6830.
- Malabarba, A. et al. (1995) 'New Semisynthetic Glycopeptides MDL 63,246 and MDL 63,042, and Other Amide Derivatives of Antibiotic A-40,926 Active against Highly Glycopeptide-resistant VanA Enterococci.', *The Journal of Antibiotics*, 48(8), pp. 869–883.
- Mann, P. A. et al. (2013) 'Murgocil is a Highly Bioactive Staphylococcal-Specific Inhibitor of the Peptidoglycan Glycosyltransferase Enzyme MurG', *ACS Chemical Biology*, 8(11), pp. 2442–2451.
- Männik, J. and Bailey, M. W. (2015) 'Spatial coordination between chromosomes and cell division proteins in *Escherichia coli*', *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR), pp. 1–8.
- Margolin, W. (2009) 'Sculpting the Bacterial Cell', *Current Biology*. Elsevier Ltd, 19(17), pp. 812–822.

- Markovski, M. et al. (2016) 'Cofactor bypass variants reveal a conformational control mechanism governing cell wall polymerase activity', *PNAS*, 113(17), pp. 4788–4793.
- Marrec-Fairley, M. et al. (2000) 'Differential functionalities of amphiphilic peptide segments of the cell-septation penicillin-binding protein 3 of Escherichia coli', *Molecular Microbiology*, 37(5), pp. 1019–1031.
- Marteyn, B. S. et al. (2014) 'ZapE is a novel cell division protein interacting with *FtsZ* and modulating the Z-ring dynamics', *mBio*, 5(2), pp. 1–10.
- Massey, T. H. et al. (2006) 'Double-Stranded DNA Translocation: Structure and Mechanism of Hexameric *FtsK*', *Molecular Cell*, 23(4), pp. 457–469.
- Masson, S. et al. (2009) « Central Domain of DivIB Caps the C-terminal Regions of the *FtsL*/DivIC Coiled-coil Rod », *Journal of Biological Chemistry*, 284(40), pp. 27687–27700.
- Matias, V. R. F. et al. (2003) « Cryo-Transmission Electron Microscopy of Frozen-Hydrated Sections of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* », *Journal of Bacteriology*, 185(20), pp. 6112–6118.
- Matsui, T. et al. (2012) « Structural reorganization of the bacterial cell-division protein *FtsZ* from *Staphylococcus aureus* », *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 68(9), pp. 1175–1188.
- Matsui, T. et al. (2014) « Structural change in *FtsZ* induced by Intermolecular interactions between Bound GTP and the T7 Loop », *Journal of Biological Chemistry*, 289(6), pp. 3501–3509.
- Mavrici, D. et al. (2014) « Mycobacterium tuberculosis *FtsX* extracellular domain activates the peptidoglycan hydrolase, RipC », *PNAS*, 111(22), pp. 8037–8042.
- McCoy, A. J. et al. (2007) « Phaser crystallographic software », *Journal of Applied Crystallography*, 40(4), pp. 658–674.
- McQuillen, R. and Xiao, J. (2020) 'Insights into the Structure, Function, and Dynamics of the Bacterial Cytokinetic *FtsZ*-Ring', *Annual Review of Biophysics*, 49(1), pp. 311–343.
- Meberg, B. M. et al. (2004) 'Endopeptidase Penicillin-Binding Proteins 4 and 7 Play Auxiliary Roles in Determining Uniform Morphology of *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 186(24), pp. 8326–8336.
- Meberg, B. M. et al. (2004) « Endopeptidase Penicillin-Binding Proteins 4 and 7 Play Auxiliary Roles in Determining Uniform Morphology of *Escherichia coli* », *Journal of Bacteriology*, 186(24), pp. 8326–8336.
- Meehan, B. M. et al. (2017) « The essential cell division protein *FtsN* contains a critical disulfide bond in a non-essential domain », *Molecular Microbiology*, 103(3), pp. 413–422.
- Meeske, A. J. et al. (2015) 'MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis*', *PNAS*, 112(20), pp. 6437–6442.
- Meeske, A. J. et al. (2016) 'SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases', *Nature*, 537(7622), p. 634.
- Meiresonne, N. Y. and Den Blaauwen, T. (2020) 'The In Vitro Non-Tetramerizing ZapA I83E Mutant Is Unable to Recruit ZapB to the Division Plane *In vivo* in *Escherichia coli*', *International journal of molecular sciences*, 21.
- Mercer, K. L. N. and Weiss, D. S. (2002) 'The *Escherichia coli* Cell Division Protein *FtsW* Is Required To Recruit Its Cognate Transpeptidase, *FtsI* (PBP3), to the Division Site', *Journal of Bacteriology*, 184(4), pp. 904–912.
- Mercier, R. et al. (2008) « The MatP/matS Site-Specific System Organizes the Terminus Region of the *E. coli* Chromosome into a Macrodomain », *Cell*, 135(3), pp. 475–485.
- Meury, J. and Devilliers, G. (1999) 'Impairment of cell division in *tolA* mutants of *Escherichia coli* at low and high medium osmolarities', *Biology of the Cell*. John Wiley & Sons, Ltd, 91(1), pp. 67–75.
- Mileykovskaya, E. et al. (2003) « Effects of Phospholipid Composition on MinD-Membrane Interactions in Vitro and *in vivo* », *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), pp. 22193–22198.

- 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', *Journal of Molecular Biology*, 260(3), pp. 289–298.
- Mitobe, J. et al. (2011) « RodZ regulates the post-transcriptional processing of the Shigella sonnei type III secretion system », *EMBO Reports*. Nature Publishing Group, 12(9), pp. 911–916.
- Miyagi, A. et al. (2018) « High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals the Inner Workings of the MinDE Protein Oscillator », *Nano Letters*. American Chemical Society, 18(1), pp. 288–296.
- Mohammadi, T. et al. (2011) « Identification of *FtsW* as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane », *The EMBO Journal*, 30(8), pp. 1425–1432.
- Mohammadi, T. et al. (2014) « Specificity of the transport of lipid II by *FtsW* in Escherichia coli », *The Journal of Bacteriology*, 289(21), pp. 14707–14718.
- Möll, A. and Thanbichler, M. (2009) 'FtsN-like proteins are conserved components of the cell division machinery in proteobacteria', *Molecular Microbiology*, 72(4), pp. 1037–1053.
- Monterroso, B. et al. (2019) « The bacterial DNA binding protein MatP involved in linking the nucleoid terminal domain to the divisome at midcell interacts with lipid membranes », *mBio*, 10(3), pp. 1–14.
- Montravers, P. and Bassetti, M. (2018) 'The ideal patient profile for new beta-lactam/beta-lactamase inhibitors', *Current opinion in infectious diseases*, 31(6), pp. 587–593.
- Moore, K. S. et al. (1993) 'Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark.', *PNAS*, 90(4), pp. 1354–1358.
- Morgenstern, R. M. et al. (2015) « RodZ links MreB to cell wall synthesis to mediate MreB rotation and robust morphogenesis », *PNAS*, 112(40), pp. 12510–12515.
- Morlot, C. et al. (2018) 'Structure of the essential peptidoglycan amidotransferase MurT/GatD complex from Streptococcus pneumoniae', *Nature Communications*, 9(1), p. 3180.
- Mosyak, L. et al. (2000) « The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an *FtsZ* fragment revealed by X-ray crystallography », *The EMBO journal*. Oxford University Press, 19(13), pp. 3179–3191.
- Moy, F. J. et al. (2000) « Solution Structure of ZipA, a Crucial Component of Escherichia coli Cell Division », *Biochemistry*. American Chemical Society, 39(31), pp. 9146–9156.
- Moynihan, P. J. and Clarke, A. J. (2010) 'O-acetylation of peptidoglycan in gram-negative bacteria : identification and characterization of peptidoglycan-acetyltransferase in Neisseria gonorrhoeae', *The Journal of biological chemistry*, 285(17), pp. 13264–13273.
- Muchová, K., Chromiková, Z. and Barák, I. (2013) 'Control of Bacillus subtilis cell shape by RodZ', *Environmental Microbiology*, 15(12), pp. 3259–3271.
- Mueller, E. A., Westfall, C. S. and Levin, P. A. (2020) 'PH-dependent activation of cytokinesis modulates Escherichia coli cell size', *PLoS Genetics*, 16(3), pp. 1–24.
- Mukherjee, P. et al. (2009) « Novel role of Wag31 in protection of mycobacteria under oxidative stress », *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 73(1), pp. 103–119.
- Müller, A. et al. (2012) 'Interaction of Type A Lantibiotics with Undecaprenol-Bound Cell Envelope Precursors', *Microbial Drug Resistance*, 18(3), pp. 261–270.
- Müller, A., Klöckner, A. and Schneider, T. (2017) 'Targeting a cell wall biosynthesis hot spot', *Natural Product Reports*, 34(7), pp. 909–932.
- Müller, P. et al. (2007) 'The essential cell division protein *FtsN* interacts with the murein (peptidoglycan) synthase PBP1B in Escherichia coli', *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), pp. 36394–36402.
- Münch, D. et al. (2012) « Identification and in vitro analysis of the GatD/MurT enzyme-complex catalyzing lipid II amidation in Staphylococcus aureus », *PLOS Pathogens*. Public Library of Science, 8(1), p. e1002509.

- Mygind, P. H. et al. (2005) 'Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus', *Nature*, 437(7061), pp. 975–980.
- Nagai, K. et al. (1990) 'Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A', *Nature*, 348(6301), pp. 515–520.
- Nanninga, N. (1991) 'Cell division and peptidoglycan assembly in *Escherichia coli*', *Molecular Microbiology*, 5(4), pp. 791–795.
- Nelson, D. E. and Young, K. D. (2000) 'Penicillin Binding Protein 5 Affects Cell Diameter, Contour, and Morphology of *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 182(6), pp. 1714–1721.
- Nelson, D. E. and Young, K. D. (2001) 'Contributions of PBP 5 and Carboxypeptidase Penicillin Binding Proteins to Maintenance of Cell Shape in *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 183(10), pp. 3055–3064.
- Ng, W., Kazmierczak, K. M. and Winkler, M. E. (2004) 'Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator', *Molecular Microbiology*, 53(4), pp. 1161–1175.
- Ngadjeua, F. et al. (2018) 'Critical impact of peptidoglycan precursor amidation on the activity of I,d-transpeptidases from *Enterococcus faecium* and *Mycobacterium tuberculosis*', *Chemistry – A European Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 24(22), pp. 5743–5747.
- Nguyen, L. T. et al. (2019) « Simulations suggest a constrictive force is required for Gram-negative bacterial cell division », *Nature communications*. Nature Publishing Group UK, 10(1), p. 1259.
- Nicholas, R. A. et al. (2003) 'Crystal Structure of Wild-type Penicillin-binding Protein 5 from *Escherichia coli*', *Journal of Biological Chemistry*, 278(52), pp. 52826–52833.
- Nicolaou, K. C. et al. (2001) 'Synthesis and Biological Evaluation of Vancomycin Dimers with Potent Activity against Vancomycin-Resistant Bacteria: Target-Accelerated Combinatorial Synthesis', *Chemistry - A European Journal*, 7(17), pp. 3824–3843.
- Nogales, E. et al. (1998) 'Tubulin and *FtsZ* form a distinct family of GTPases', *Nature Structural Biology*, 5(6), pp. 451–458.
- Noirclerc-Savoye, M. et al. (2013) « Reconstitution of Membrane Protein Complexes Involved in Pneumococcal Septal Cell Wall Assembly », *PLoS ONE*, 8(9), p. e 75522.
- Nolivos, S. et al. (2016) 'MatP regulates the coordinated action of topoisomerase IV and MukBEF in chromosome segregation', *Nature Communications*, 7, p. 10466.
- Ogura, K. and Koyama, T. (1998) 'Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation', *Chemical Reviews*. American Chemical Society, 98(4), pp. 1263–1276.
- Ohashi, T. et al. (2002) « Structural Evidence that the P/Q Domain of ZipA Is an Unstructured, Flexible Tether between the Membrane and the C-Terminal *FtsZ*-Binding Domain », *Journal of Bacteriology*, 184(15), pp. 4313–4315.
- Ohashi, T. et al. (2007) 'An experimental study of GFP-based FRET, with application to intrinsically unstructured proteins', *Protein science : a publication of the Protein Society*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 16(7), pp. 1429–1438.
- Oliva, M. A., Cordell, S. C. and Löwe, J. (2004) 'Structural insights into *FtsZ* protofilament formation', *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(12), pp. 1243–1250.
- Ortiz, C. et al. (2015) 'The keepers of the ring: Regulators of *FtsZ* assembly', *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), pp. 57–67.
- Osawa, M. and Erickson, H. P. (2005) 'Probing the domain structure of *FtsZ* by random truncation and insertion of GFP', *Microbiology*, 151(12), pp. 4033–4043.
- Osawa, M. and Erickson, H. P. (2006) 'FtsZ from divergent foreign bacteria can function for cell division in *Escherichia coli*', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 188(20), pp. 7132–7140.
- Özbaykal, G. et al. (2020) 'The transpeptidase PBP2 governs initial localization and activity of the major cell-wall synthesis machinery in *E. coli*', *eLife*, 9, pp. 1–37.

- Packiam, M. et al. (2015) 'Structural characterization of muropeptides from Chlamydia trachomatis peptidoglycan by mass spectrometry resolves "chlamydial anomaly"', *PNAS*, 112(37), pp. 11660–11665.
- Paradis-Bleau, C. et al. (2010) 'Lipoprotein Cofactors Located in the Outer Membrane Activate Bacterial Cell Wall Polymerases', *Cell*, 143(7), pp. 1110–1120.
- Park, K.-T. et al. (2011) 'The Min Oscillator Uses MinD-Dependent Conformational Changes in MinE to Spatially Regulate Cytokinesis', *Cell*. Elsevier, 146(3), pp. 396–407.
- Park, K.-T. et al. (2012) 'Mechanism of the asymmetric activation of the MinD ATPase by MinE', *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 85(2), pp. 271–281.
- Parsons, L. M., Grishaev, A. and Bax, A. (2008) 'The Periplasmic Domain of TolR from Haemophilus influenzae Forms a Dimer with a Large Hydrophobic Groove: NMR Solution Structure and Comparison to SAXS Data', *Biochemistry*, 47(10), pp. 3131–3142.
- Parsons, L. M., Lin, F. and Orban, J. (2006) 'Peptidoglycan Recognition by Pal, an Outer Membrane Lipoprotein', *Biochemistry*, 45(7), pp. 2122–2128.
- Pastoret, S. et al. (2004) 'Functional analysis of the cell division protein *FtsW* of *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 186(24), pp. 8370–8379.
- Pazos, M. and Peters, K. (2019) 'Peptidoglycan', in Kuhn, A. (ed.) *Subcell biochem*. Cham: Springer International Publishing, pp. 127–168.
- Pazos, M. et al. (2018) « Z-ring membrane anchors associate with cell wall synthases to initiate bacterial cell division », *Nature communications*. Nature Publishing Group UK, 9(1), p. 5090.
- Pazos, M., Natale, P. and Vicente, M. (2013) 'A Specific Role for the ZipA Protein in Cell Division', *Journal of Biological Chemistry*, 288(5), pp. 3219–3226.
- Pennartz, A. et al. (2009) 'Substrate-Induced Inactivation of the *Escherichia coli* AmiD N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase Highlights a New Strategy To Inhibit This Class of Enzyme', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7), pp. 2991–2997.
- Pepper, E. D., Farrell, M. J. and Finkel, S. E. (2006) 'Role of penicillin-binding protein 1b in competitive stationary-phase survival of *Escherichia coli*', *FEMS Microbiology Letters*, 263(1), pp. 61–67.
- Pérals, K. et al. (2001) 'Interplay between recombination, cell division and chromosome structure during chromosome dimer resolution in *Escherichia coli*', *Molecular Microbiology*, 39(4), pp. 904–913.
- Perdih, A. et al. (2015) 'Furan-based benzene mono- and dicarboxylic acid derivatives as multiple inhibitors of the bacterial Mur ligases (MurC-MurF): Experimental and computational characterization', *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 29(6), pp. 541–560.
- Pereira, A. C. et al. (2015) 'Chemical shift assignments and secondary structure determination of the ectodomain of *Bacillus subtilis* morphogenic protein RodZ', *Biomolecular NMR Assignments*, 9(2), pp. 285–288.
- Perez, A. J. et al. (2019) « Movement dynamics of divisome proteins and PBP2x:*FtsW* in cells of *Streptococcus pneumoniae* », *PNAS*, 116(8), pp. 3211–3220.
- Peters, N. T. et al. (2013) « Structure-function analysis of the LytM domain of EnvC, an activator of cell wall remodelling at the *Escherichia coli* division site », *Molecular Microbiology*, 89(4), pp. 690–701.
- 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', *Journal of Bacteriology*, 193(18), pp. 4973–4983.
- Pfeifer S, Fritz M, Lobo R, McClure R, Goldberg J, Thomas M, Pisarska M, Widra E, Schattman G, Licht M, Sandlow J, Collins J, Cedars M, Rosen M, Vernon M, Racowsky C, Davis O, Dumesic D, Odem R, Barnhart K, Gracia C, Catherino W, Rebar R, L. B. A. (2013) 'Use of clomiphene citrate in infertile women: a committee opinion', *Fertility and Sterility*, 100(2), pp. 341–348.
- Pichoff, S. and Lutkenhaus, J. (2002) 'Unique and overlapping roles for ZipA and *FtsA* in septal ring assembly in *Escherichia coli*', *The EMBO journal*. Oxford University Press, 21(4), pp. 685–693.
- Pichoff, S. and Lutkenhaus, J. (2005) 'Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in *FtsA*', *Molecular Microbiology*, 55(6), pp. 1722–1734.

- Pichoff, S. et al. (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', *Molecular Microbiology*, 83(1), pp. 151–167.
- 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', *Molecular Microbiology*, 95(6), pp. 971–987.
- Pichoff, S., Du, S. and Lutkenhaus, J. (2018) 'Disruption of divisome assembly rescued by FtsN–FtsA interaction in Escherichia coli', *PNAS*, 115(29), pp. E6855–E6862.
- Pichoff, S., Du, S. and Lutkenhaus, J. (2019) 'Roles of FtsEX in cell division', *Research in Microbiology*. Elsevier Ltd, 170(8), pp. 374–380.
- Piette, A. et al. (2004) 'Structural determinants required to target penicillin-binding protein 3 to the septum of Escherichia coli', *Journal of Bacteriology*, 186(18), pp. 6110–6117.
- Pilhofer, M. et al. (2013) 'Discovery of chlamydial peptidoglycan reveals bacteria with murein sacculi but without FtsZ', *Nature Communications*, 4(1), p. 2856.
- Potluri, L.-P., Kannan, S. and Young, K. D. (2012) 'ZipA is required for FtsZ-dependent preseptal peptidoglycan synthesis prior to invagination during cell division', *Journal of bacteriology*. 2012/07/27. American Society for Microbiology, 194(19), pp. 5334–5342.
- Prescott et al. (2007) 'Microbiologie' (7ed.) Bruxelles, Belgique : Edition De Boeck Université.
- Priyadarshini, R., de Pedro, M. A. and Young, K. D. (2007) 'Role of Peptidoglycan Amidases in the Development and Morphology of the Division Septum in Escherichia coli', *Journal of Bacteriology*, 189(14), pp. 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', *Journal of Bacteriology*, 188(15), pp. 5345–5355.
- Ramirez-Diaz, D. A. et al. (2018) « Treadmilling analysis reveals new insights into dynamic FtsZ ring architecture », *PLoS biology*. Public Library of Science, 16(5), pp. e2004845–e2004845.
- Ramm, B. et al. (2018) 'The MinDE system is a generic spatial cue for membrane protein distribution in vitro', *Nature Communications*, 9(1), p. 3942.
- Randich, A. M. and Brun, Y. V. (2015) 'Molecular mechanisms for the evolution of bacterial morphologies and growth modes', *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Ranjit, D. K. and Young, K. D. (2013) 'The Rcs stress response and accessory envelope proteins are required for de novo generation of cell shape in Escherichia coli', *Journal of Bacteriology*, 195(11), p. 2452 LP-2462.
- Raskin, D. M. and de Boer, P. A. J. (1999) 'Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of Escherichia coli', *PNAS*, 96(9), pp. 4971 LP – 4976.
- Rassam, P. et al. (2018) « Intermembrane crosstalk drives inner-membrane protein organization in Escherichia coli », *Nature Communications*, 9(1), p. 1082.
- RayChaudhuri, D. (1999) 'ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division', *The EMBO journal*, 18(9), pp. 2372–2383.
- Rayman, M. K., Aris, B. and Hurst, A. (1981) 'Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats', *Applied and environmental microbiology*, 41(2), pp. 375–380.
- Raymond, J. B. et al. (2005) « Identification of the namH gene, encoding the hydroxylase responsible for the N-glycolylation of the Mycobacterial peptidoglycan », *The Journal of biological chemistry*, 280(1), pp. 326–333.
- Reddy, M. (2007) « Role of FtsEX in Cell Division of Escherichia coli: Viability of ftsEX Mutants Is Dependent on Functional Sulfi or High Osmotic Strength », *Journal of Bacteriology*, 189(1), pp. 98–108.
- Redick, S. D. et al. (2005) 'Mutants of FtsZ targeting the protofilament interface: effects on cell division and GTPase activity', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 187(8), pp. 2727–2736.

- Reichmann, N. T. et al. (2019) « SEDS–bPBP pairs direct lateral and septal peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus* », *Nature Microbiology*. Springer US, 4(8), pp. 1368–1377.
- Renner, L. D. and Weibel, D. B. (2012) ‘MinD and MinE Interact with Anionic Phospholipids and Regulate Division Plane Formation in *Escherichia coli*’, *Journal of Biological Chemistry*, 287(46), pp. 38835–38844.
- Renner, L. D. et al. (2014) « Studying Biomolecule Localization by Engineering Bacterial Cell Wall Curvature », *PLOS ONE*. Public Library of Science, 8(12), p. e84143.
- Reynolds, P. E. (1989) « Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics », *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 8(11), pp. 943–950.
- Rice, K. C. and Bayles, K. W. (2003) ‘Death’s toolbox: examining the molecular components of bacterial programmed cell death’, *Molecular Microbiology*, 50(3), pp. 729–738.
- Rico, A. I. et al. (2004) « Role of two essential domains of *Escherichia coli FtsA* in localization and progression of the division ring », *Molecular Microbiology*, 53(5), pp. 1359–1371.
- Roach, E. J. et al. (2016) ‘Structure and Mutational Analyses of *Escherichia coli ZapD* Reveal Charged Residues Involved in *FtsZ* Filament Bundling’, *Journal of Bacteriology*, 198(11), pp. 1683–1693.
- Roach, E. J., Kimber, M. S. and Khursigara, C. M. (2014) ‘Crystal Structure and Site-directed Mutational Analysis Reveals Key Residues Involved in *Escherichia coli ZapA*’, 289(34), pp. 23276–23286.
- Robertson, G. T. et al. (2007) ‘A Novel Indole Compound That Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Growth by Targeting *MreB* Is a Substrate for *MexAB-OprM*’, *Journal of Bacteriology*, 189(19), pp. 6870 LP – 6881.
- Robichon, C. et al. (2011) ‘Role of Leucine Zipper Motifs in Association of the *Escherichia coli* Cell Division Proteins *FtsL* and *FtsB*’, 193(18), pp. 4988–4992.
- Rocaboy, M. et al. (2013) ‘The crystal structure of the cell division amidase amic reveals the fold of the AMIN domain, a new peptidoglycan binding domain’, *Molecular Microbiology*, 90(2), pp. 267–277.
- Rohs, P. D. A. et al. (2018) ‘A central role for PBP2 in the activation of peptidoglycan polymerization by the bacterial cell elongation machinery’, *PLoS Genetics*, 14(10), pp. 1–25.
- Romeis, T. and Höltje, J. V. (1994) ‘Specific interaction of penicillin-binding proteins 3 and 7/8 with soluble lytic transglycosylase in *Escherichia coli*’, *Journal of Biological Chemistry*, 269(34), pp. 21603–21607.
- Roseboom, W. et al. (2018) ‘Mapping the Contact Sites of the *Escherichia coli* Division-Initiating Proteins *FtsZ* and *ZapA* by BAMG Cross-Linking and Site-Directed Mutagenesis’, *International journal of molecular sciences*. MDPI, 19(10), p. 2928..
- Rued, B. E. et al. (2017) « Suppression and synthetic-lethal genetic relationships of *D gpsB* mutations indicate that *GpsB* mediates protein phosphorylation and penicillin-binding protein interactions in *Streptococcus pneumoniae* D39 », 103(2), pp. 931–957.
- Rued, B. E. et al. (2019) “Structure of the Large Extracellular Loop of *FtsX* and Its Interaction with the Essential Peptidoglycan Hydrolase *PcsB* in *Streptococcus pneumoniae*”, *mBio*. Edited by L. S. McDaniel, 10(1), pp. e02622-18.
- Ruiz, N. (2008) ‘Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*’, *PNAS*, 105(40), pp. 15,553–7.
- Rush, T. S. et al. (2005) ‘A Shape-Based 3-D Scaffold Hopping Method and Its Application to a Bacterial Protein–Protein Interaction’, *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(5), pp. 1489–1495.
- Russo, T. A. et al. (2011) ‘*In vivo* and *in vitro* activity of the siderophore monosulfactam BAL30072 against *Acinetobacter baumannii*’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(4), pp. 867–873.
- Sahl, H.-G. and Bierbaum, G. (1998) ‘LANTIBIOTICS: Biosynthesis and Biological Activities of Uniquely Modified Peptides from Gram-Positive Bacteria’, *Annual Review of Microbiology*, 52(1), pp. 41–79.

- Salama, N. R. (2020) 'Cell morphology as a virulence determinant: lessons from *Helicobacter pylori*', *Current Opinion in Microbiology*, 54, pp. 11–17.
- Saleh, O. A. et al. (2004) "Fast, DNA-sequence independent translocation by *FtsK* in a single-molecule experiment", *The EMBO journal*. 2004/05/27. Nature Publishing Group, 23(12), pp. 2430–2439.
- Saleh, O. A. et al. (2005) 'Analysis of DNA supercoil induction by *FtsK* indicates translocation without groove-tracking', *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(5), pp. 436–440.
- Salje, J. et al. (2011) 'Direct Membrane Binding by Bacterial Actin MreB', *Molecular Cell*, 43(3), pp. 478–487.
- Sangshetti, J. N. et al. (2017) *Mur Ligase Inhibitors as Anti-bacterials: A Comprehensive Review, Current Pharmaceutical Design*.
- Sarkar, S. K., Chowdhury, C. and Ghosh, A. S. (2010) 'Deletion of penicillin-binding protein 5 (PBP5) sensitises *Escherichia coli* cells to β-lactam agents', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(3), pp. 244–249.
- Sauvage, E. and Terrak, M. (2016) 'Glycosyltransferases and transpeptidases/penicillin-binding proteins: Valuable targets for new antibacterials', *Antibiotics*, 5(1), pp. 1–27.
- Sauvage, E. et al. (2008) "The penicillin-binding proteins : structure and role in peptidoglycan biosynthesis", *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), pp. 234–258.
- Sauvage, E. et al. (2014) "Crystal structure of penicillin-binding protein 3 (PBP3) from *Escherichia coli*", *PLoS one*. Public Library of Science, 9(5), pp. e98042–e98042.
- Scheffers, D.-J. et al. (2002) "GTP Hydrolysis of Cell Division Protein *FtsZ*: Evidence that the Active Site Is Formed by the Association of Monomers +", *Biochemistry*, 41(2), pp. 521–529.
- Schiffer, G and Höltje, J. (1999) 'Cloning and characterization of PBP1C, a third member of the multimodular class A penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*', *Journal of Biological Chemistry*, 274(45), pp. 32031–32039.
- Schleifer, K. H. and Kandler, O. (1972) 'Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications.', *Bacteriological Reviews*, 36(4), p. 407 LP-477.
- Schmidt, K. L. et al. (2004) "A predicted ABC transporter, *FtsEX*, is needed for cell division in *Escherichia coli*", *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 186(3), pp. 785–793.
- Schmidt, L. S., Botta, G. and Park, J. T. (1981) 'Effects of furazlocillin, a beta-lactam antibiotic which binds selectively to penicillin-binding protein 3, on *Escherichia coli* mutants deficient in other penicillin-binding proteins.', *Journal of Bacteriology*, 145(1), pp. 632–637.
- Schmitt, P. et al. (2010) 'Insight into Invertebrate Defensin Mechanism of Action', *Journal of Biological Chemistry*, 285(38), pp. 29208–29216.
- Schneider, T. et al. (2009) 'The Lipopeptide Antibiotic Friulimicin B Inhibits Cell Wall Biosynthesis through Complex Formation with Bactoprenol Phosphate', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), pp. 1610–1618.
- Schneider, T. et al. (2010) 'Plectasin, a Fungal Defensin, Targets the Bacterial Cell Wall Precursor Lipid II', *Science*, 328(5982), pp. 1168–1172.
- Schneider, T. R. et al. (2000) 'Ab initio structure determination of the lantibiotic mersacidin', *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 56(6), pp. 705–713.
- Schumacher, M. A. et al. (2016) 'Structural and functional analyses reveal insights into the molecular properties of the *Escherichia coli* Z ring stabilizing protein, ZapC', *Journal of Biological Chemistry*, 291(5), pp. 2485–2498.
- Schumacher, M. A. et al. (2017) 'Structure of the z ring-associated protein, zapd, bound to the c-terminal domain of the tubulin-like protein, *ftsz*, suggests mechanism of z ring stabilization through *ftsz* cross-linking', *Journal of Biological Chemistry*, 292(9), pp. 3740–3750.
- Schwartz, B. et al. (2002) "A kinetic characterization of the glycosyltransferase activity of *Escherichia coli* PBP1b and development of a continuous fluorescence assay", *Biochemistry*. American Chemical Society, 41(41), pp. 12552–12561.

- Schwartz, B., Markwalder, J. A. and Wang, Y. (2001) 'Lipid II: Total Synthesis of the Bacterial Cell Wall Precursor and Utilization as a Substrate for Glycosyltransfer and Transpeptidation by Penicillin Binding Protein (PBP) 1b of Escherichia coli', *Journal of the American Chemical Society*, 123(47), pp. 11638–11643.
- Scott Cayley, D., Guttman, H. J. and Thomas Record, M. (2000) 'Biophysical Characterization of Changes in Amounts and Activity of Escherichia coli Cell and Compartment Water and Turgor Pressure in Response to Osmotic Stress', *Biophysical Journal*, 78(4), pp. 1748–1764.
- Severin, A. et al. (2004) 'Penicillin-Binding Protein 2 Is Essential for Expression of High-Level Vancomycin Resistance and Cell Wall Synthesis in Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus Carrying the Enterococcal vanA Gene Complex', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12), pp. 4566–4573.
- Sham, L., Jensen, K. R. and Bruce, K. E. (2013) 'Involvement of *FtsE* ATPase and *FtsX* Extracellular Loops 1 and 2 in *FtsEX-PcsB* Complex Function in Cell Division of *Streptococcus pneumoniae* D39', *Mbio*, 4(4), pp. 1–9.
- Sham, L.-T. et al. (2011) 'Essential PcsB putative peptidoglycan hydrolase interacts with the essential *FtsXS*pn cell division protein in *Streptococcus pneumoniae* D39', *PNAS*, 108(45), pp. E1061–E1069.
- Sham, L.-T. et al. (2013) 'Involvement of *FtsE* ATPase and *FtsX* Extracellular Loops 1 and 2 in *FtsEX-PcsB* Complex Function in Cell Division of *Streptococcus pneumoniae* D39', *mBio*, 4(4).
- Sham, L.-T. et al. (2014) 'MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis', *Science*, 345(6193), p. 220 LP-222.
- Sherratt, D. J. et al. (2010) 'The Escherichia coli DNA translocase *FtsK*', *Biochemical Society Transactions*, 38(2), pp. 395–398.
- Shi, H. et al. (2017) 'Deep Phenotypic Mapping of Bacterial Cytoskeletal Mutants Reveals Physiological Robustness to Cell Size', *Current Biology*. Elsevier, 27(22), pp. 3419–3429.e4.
- Shi, H. et al. (2018) 'Review How to Build a Bacterial Cell : MreB as the Foreman of E. coli Construction', *Cell*. Elsevier Inc., 172(6), pp. 1294–1305.
- Shiomi, D. et al. (2013) 'Mutations in cell elongation genes mreB, mrdA and mrdB suppress the shape defect of RodZ-deficient cells', *Molecular microbiology*. 2013/01/21. Blackwell Publishing Ltd, 87(5), pp. 1029–1044.
- Shiomi, D., Sakai, M. and Niki, H. (2008) 'Determination of bacterial rod shape by a novel cytoskeletal membrane protein', *EMBO Journal*, 27(23), pp. 3081–3091.
- Shockman, G. D. and Höltje, J. V (1994) 'Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases.', *Bacterial Cell Wall*, pp. 131–166.
- Siefert, J. L. and Fox, G. E. (1998) 'Phylogenetic mapping of bacterial morphology', *Microbiology*, 144, pp. 2803–2808.
- Sieger, B. and Bramkamp, M. (2015) 'Interaction sites of DivIVA and RodA from Corynebacterium glutamicum', *Frontiers in Immunology*, 5(January), pp. 1–11.
- Siegrist, M. S. et al. (2013) 'd-Amino Acid Chemical Reporters Reveal Peptidoglycan Dynamics of an Intracellular Pathogen', *ACS Chemical Biology*. American Chemical Society, 8(3), pp. 500–505.
- Silver, L. L. (2007) 'Multi-targeting by monotherapeutic antibacterials', *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(1), pp. 41–55.
- Singh, S. K. et al. (2012) 'Three redundant murein endopeptidases catalyse an essential cleavage step in peptidoglycan synthesis of Escherichia coli K12', *Molecular Microbiology*, 86(5), pp. 1036–1051.
- Sjodt, M. et al. (2018) 'Structure of the Peptidoglycan Polymerase RodA Resolved by Evolutionary Coupling Analysis', *Nature*, 556(7699), pp. 118–121.
- Sjodt, M. et al. (2020) 'Structural coordination of polymerization and crosslinking by a SEDS–bPBP peptidoglycan synthase complex', *Nature Microbiology*, 5(6), pp. 813–820.
- Skalweit, M.J. et al. (2016) 'Bulgecin A as a β-lactam enhancer for carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates containing various resistance mechanisms', *Drug Design, Development and Therapy*, 10, pp. 3013–3020.

- Sliusarenko, O. et al. (2010) 'Processivity of peptidoglycan synthesis provides a built-in mechanism for the robustness of straight-rod cell morphology', *PNAS*, 107(22), pp. 10086–10091.
- Smith, T. J., Blackman, S. A. and Foster, S. J. (2000) 'Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions', *Microbiology*, 146(2), pp. 249–262.
- Söderström, B. and Daley, D. O. (2017) 'The bacterial divisome: more than a ring?', *Current Genetics*, 63(2), pp. 161–164.
- Söderström, B. et al. (2016) 'Coordinated disassembly of the divisome complex in *Escherichia coli*', *Molecular Microbiology*, 101(3), pp. 425–438.
- Söderström, B. et al. (2018) 'Spatial separation of *FtsZ* and *FtsN* during cell division', *Molecular Microbiology*, 107(3), pp. 387–401.
- Söderström, B., Chan, H. and Daley, D. O. (2019) 'Super-resolution images of peptidoglycan remodelling enzymes at the division site of *Escherichia coli*', *Current Genetics*. Springer Berlin Heidelberg, 65(1), pp. 99–101.
- Sossong, T. M. et al. (1999) 'Self-Activation of Guanosine Triphosphatase Activity by Oligomerization of the Bacterial Cell Division Protein *FtsZ* †', *Biochemistry*, 38(45), pp. 14843–14850.
- Spratt, B. G. (1975) 'Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12', *PNAS*, 72(8), p. 2999 LP-3003.
- Spratt, B. G. and Bnl, B. (1985) 'Lysis of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics : deletion analysis of the role of penicillin-binding proteins 1A and 1B', *Microbiology society*, 383(10), pp. 2839–2845.
- Spratt, B. G. and Strominger, J. L. (1976) 'Identification of the major penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* as D-alanine carboxypeptidase IA', *Journal of bacteriology*, 127(1), pp. 660–663.
- Spratt, B. G. and Strominger, J. L. (1976) 'Identification of the Major Penicillin-Binding Proteins of *Escherichia coli* as d-Alanine Carboxypeptidase IA', *Journal of Bacteriology*, 127(1), pp. 660–663.
- Stouf, M., Meile, J.-C. and Cornet, F. (2013) 'FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*', *PNAS*, 110(27), pp. 11157–11162.
- Straus, S. K. and Hancock, R. E. W. (2006) 'Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(9), pp. 1215–1223.
- Strynadka, N. C. J. and James, M. N. G. (1996) 'Lysozyme: A model enzyme in protein crystallography', in, pp. 185–222.
- Sung, M. T. et al. (2009) 'Crystal structure of the membrane-bound bifunctional transglycosylase PBP1b from *Escherichia coli*', *PNAS*, 106(22), pp. 8824–8829.
- Sung, M.-T. et al. (2009) 'Crystal structure of the membrane-bound bifunctional transglycosylase PBP1b from *Escherichia coli*', *PNAS*, 106(22), pp. 8824–8829.
- Sycuro, L. K. et al. (2010) 'Peptidoglycan Crosslinking Relaxation Promotes *Helicobacter pylori*'s Helical Shape and Stomach Colonization', *Cell*. Elsevier Ltd, 141(5), pp. 822–833.
- Szczepaniak, J. et al. (2020b) 'The lipoprotein Pal stabilises the bacterial outer membrane during constriction by a mobilisation-and-capture mechanism', *Nature Communications*, 11(1), pp. 112–114.
- Szczepaniak, J., Press, C. and Kleanthous, C. (2020a) 'The multifarious roles of Tol-Pal in Gram-negative bacteria', *FEMS Microbiology Reviews*, 53(9), pp. 1689–1699.
- Szwedziak, P. and Löwe, J. (2013) 'Do the divisome and elongasome share a common evolutionary past?', *Current Opinion in Microbiology*, 16(6), pp. 745–751.
- Szwedziak, P. et al. (2012) 'FtsA forms actin-like protofilaments.', *The EMBO journal*, 31(10), pp. 2249–2260.
- Szwedziak, P. et al. (2014) « Architecture of the ring formed by the tubulin homologue *FtsZ* in bacterial cell division », *eLife*. eLife Sciences Publications, Ltd, 3, pp. e04601–e04601.

- Taguchi, A. et al. (2019) 'FtsW is a peptidoglycan polymerase that is functional only in complex with its cognate penicillin-binding protein', *Nature Microbiology*, 4(4), pp. 587–594.
- Takacs, C. N. et al. (2010) 'MreB Drives De Novo Rod Morphogenesis in Caulobacter crescentus via Remodeling of the Cell Wall', *Journal of Bacteriology*, 192(6), pp. 1671 LP – 1684.
- Tamames, J. et al. (2001) « Bringing gene order into bacterial shape », *Trends in Genetics*. Elsevier, 17(3), pp. 124–126.
- Tamura, N. et al. (1990) 'Synthesis and antibacterial activity of lacticin derivatives.', *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 38(1), pp. 116–122.
- Tanino, T. et al. (2011) 'Mechanistic Analysis of Muraymycin Analogues: A Guide to the Design of MraY Inhibitors', *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(24), pp. 8421–8439.
- Tavares, A. C. et al. (2015) « MreC and MreD Proteins Are Not Required for Growth of *Staphylococcus aureus* », *PLOS ONE*. Public Library of Science, 10(10), p. e0140523.
- Taylor, J. A. et al. (2020) 'Distinct cytoskeletal proteins define zones of enhanced cell wall synthesis in *Helicobacter pylori*', *eLife*, 9, p. e52482.
- Templin, M. F., Edwards, D. H. and Holtje, J. V. (1992) 'A murein hydrolase is the specific target of bulgecin in *Escherichia coli*', *Journal of Biological Chemistry*, 267(28), pp. 20039–20043.
- Templin, M. F., Ursinus, A. and Höltje, J. (1999) 'A defect in cell wall recycling triggers autolysis during the stationary growth phase of *Escherichia coli*', *The EMBO Journal*, 18(15), pp. 4108–4117.
- Terrak, M. et al. (1999) « The Catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing Penicillin-Binding Protein 1b of Escherichia Coli », *Molecular Microbiology*, 34(2), pp. 350–364.
- Terrak, M. et al. (2008) 'Importance of the Conserved Residues in the Peptidoglycan Glycosyltransferase Module of the Class A Penicillin-binding Protein 1b of *Escherichia coli*', *Journal of Biological Chemistry*, 283(42), pp. 28464–28470.
- Thanbichler, M. and Shapiro, L. (2006) 'MipZ, a Spatial Regulator Coordinating Chromosome Segregation with Cell Division in Caulobacter', *Cell*, 126(1), pp. 147–162.
- Thunnissen, A.-M. W. H. et al. (1994) « Doughnut-shaped structure of a bacterial muramidase revealed by X-ray crystallography », *Nature*, 367(6465), pp. 750–753.
- Thunnissen, A.-M. W. H. et al. (1995) « Structure of the 70-kDa Soluble Lytic Transglycosylase Complexed with Bulgecin A. Implications for the Enzymic Mechanism », *Biochemistry*, 34(39), pp. 12729–12737.
- Tickle, I. J. et al. (2018) 'STARANISO', *United Kingdom: Global Phasing Ltd*.
- 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.', *PNAS*, 54(4), pp. 1133–1141.
- Tonthat, N. K. et al. (2011) 'Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor, SlmA, keeps cytokinesis in check', *The EMBO journal*. 2010/11/26. Nature Publishing Group, 30(1), pp. 154–164.
- Tonthat, N. K. et al. (2013) 'SlmA forms a higher-order structure on DNA that inhibits cytokinetic Z-ring formation over the nucleoid', *PNAS*, 110(26), pp. 10586–10591.
- Tsang, M. and Bernhardt, T. G. (2015) 'A role for the *FtsQLB* complex in cytokinetic ring activation revealed by an *ftsL* allele that accelerates division', *Molecular Microbiology*, 95(January), pp. 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 Genetics*.
- Turner, R. D. et al. (2018) 'Molecular imaging of glycan chains couples cell-wall polysaccharide architecture to bacterial cell morphology', *Nature Communications*, 9(1), p. 1263.

- Typas, A. et al. (2010) 'Regulation of peptidoglycan synthesis by outer-membrane proteins', *Cell*, 143(7), pp. 1097–1109.
- Typas, A. et al. (2011) « From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology », *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 10(2), pp. 123–136.
- Uehara, T. and Park, J. T. (2008) 'Peptidoglycan Recycling', *EcoSal Plus*, 3(1), pp. 1–8.
- 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', *Journal of bacteriology*, 185(2), pp. 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', *Journal of bacteriology*, 189(15), pp. 5634–5641.
- Uehara, T. et al. (2010) 'Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis', *The EMBO journal*, 29(8), pp. 1412–1422.
- 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', *Journal of Bacteriology*, 191(16), pp. 5094–5107.
- Ulisse, V. D. et al. (2007) 'Three functional subdomains of the Escherichia coli FtsQ protein are involved in its interaction with the other division proteins', *Microbiology*, 153(May), pp. 124–138.
- Ulm, H. and Schneider, T. (2016) 'Targeting bactoprenol-coupled cell envelope precursors', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(18), pp. 7815–7825.
- Ulm, H. et al. (2012) « Antimicrobial Host Defensins – Specific Antibiotic Activities and Innate Defense Modulation », *Frontiers in Immunology*, 3.
- Ultee, E. et al. (2019) « Stress-induced adaptive morphogenesis in bacteria », *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, 74, pp. 97–141.
- Ursell, T. S. et al. (2014) 'Rod-like bacterial shape is maintained by feedback between cell curvature and cytoskeletal localization', *PNAS*, 111(11), pp. 1025–1034.
- Ursinus, A. et al. (2004) « Murein (peptidoglycan) binding property of the essential cell division protein FtsN from Escherichia coli », *Journal of Bacteriology*, 186(20), pp. 6728–6737.
- Val, M.-E. et al. (2008) « FtsK-Dependent Dimer Resolution on Multiple Chromosomes in the Pathogen Vibrio cholerae », *PLoS Genetics*. Edited by D. K. Chatteraj, 4(9), p. e1000201.
- van Dam, V. et al. (2007) 'Transmembrane transport of peptidoglycan precursors across model and bacterial membranes', *Molecular Microbiology*, 64(4), pp. 1105–1114.
- van den Berg van Saparoea, H. B. et al. (2013) « Fine-mapping the Contact Sites of the Escherichia coli Cell Division Proteins FtsB and FtsL on the FtsQ Protein », *Journal of Biological Chemistry*, 288(34), pp. 24340–24350.
- Van Den Bogaart, G. et al. (2007) « Protein mobility and diffusive barriers in Escherichia coli : consequences of osmotic stress », *Molecular Microbiology*, 64(3), pp. 858–871.
- Van den Ent, F. and Löwe, J. (2000) 'Crystal structure of the cell division protein FtsA from Thermotoga maritima', *The EMBO journal*. Oxford University Press, 19(20), pp. 5300–5307.
- Van Den Ent, F. et al. (2006) 'Dimeric structure of the cell shape protein MreC and its functional implications', *Molecular Microbiology*, 62(6), pp. 1631–1642.
- Van den Ent, F. et al. (2008) 'Structural and mutational analysis of the cell division protein FtsQ', *Molecular Microbiology*, 68(1), pp. 110–123.
- Van Den Ent, F. et al. (2010) 'Bacterial actin MreB assembles in complex with cell shape protein RodZ', *EMBO Journal*, 29(6), pp. 1081–1090.

- Van den Ent, F. et al. (2014) 'Bacterial actin MreB forms antiparallel double filaments', *eLife*, 2014(3), pp. 1–22.
- Van den Ent, F., Amos, L. A. and Löwe, J. (2001) 'Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton', *Nature*, 413(6851), pp. 39–44.
- van der Ploeg, R. et al. (2013) 'Colocalization and interaction between elongasome and divisome during a preparative cell division phase in Escherichia coli', *Molecular Microbiology*, 87(5), pp. 1074–1087.
- Van der Ploeg, R. et al. (2013) 'Colocalization and interaction between elongasome and divisome during a preparative cell division phase in Escherichia coli', *Molecular Microbiology*, 87(5), pp. 1074–1087.
- van Heijenoort, J. (2011) 'Membrane intermediates in the peptidoglycan metabolism of Escherichia coli: possible roles of PBP 1b and PBP 3.', *Natural Product Reports*, 18(5), p. 503–19.
- van Heijenoort, Y. et al. (1992) 'Membrane intermediates in the peptidoglycan metabolism of Escherichia coli: possible roles of PBP 1b and PBP 3.', *Journal of Bacteriology*, 174(11), p. 3549 LP-3557.
- Van Teeffelen, S. et al. (2011) 'The bacterial actin MreB rotates, and rotation depends on cell-wall assembly', *PNAS*, 108(38), pp. 15822–15827.
- Varney, K. M. et al. (2013) 'Turning Defense into Offense: Defensin Mimetics as Novel Antibiotics Targeting Lipid II', *PLoS Pathogens*. Edited by M. Zasloff, 9(11), p. e1003732.
- Vats, P. and Rothfield, L. (2007) 'Duplication and segregation of the actin (MreB) cytoskeleton during the prokaryotic cell cycle', *PNAS*, 104(45), pp. 17795–17800.
- Vats, P., Shih, Y.-L. and Rothfield, L. (2009) 'Assembly of the MreB-associated cytoskeletal ring of Escherichia coli', *Molecular Microbiology*, 72(1), pp. 170–182.
- Vázquez-Laslop, N. et al. (2001) « Molecular sieve mechanism of selective release of cytoplasmic proteins by osmotically shocked Escherichia coli », *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 183(8), pp. 2399–2404.
- Vecchiarelli, A. G. et al. (2014) 'Differential affinities of MinD and MinE to anionic phospholipid influence Min patterning dynamics in vitro', *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 93(3), pp. 453–463.
- Vega, D. E. and Margolin, W. (2019) 'Direct interaction between the two Z ring membrane anchors *FtsA* and *ZipA*', *Journal of Bacteriology*, 201(4), pp. e00579-18.
- Vigouroux, A. et al. (2020) 'Class-A penicillin binding proteins do not contribute to cell shape but repair cellwall defects', *eLife*, 9, pp. 1–26.
- Villanelo, F. et al. (2011) « A model for the Escherichia coli *FtsB/FtsL/FtsQ* cell division complex », *BMC structural biology*. BioMed Central, 11, p. 28.
- Vischer, N. O. E. et al. (2015) « Cell age dependent concentration of Escherichia coli divisome proteins analyzed with ImageJ and ObjectJ », *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Vollmer, W. (2008a) 'Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan', *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), pp. 287–306.
- Vollmer, W. and Bertsche, U. (2008) 'Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in Escherichia coli', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(9), pp. 1714–1734.
- Vollmer, W. and Tomasz, A. (2000) 'The *PgdA* gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*', *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), pp. 20496–20501.
- Vollmer, W. et al. (2008c) « Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases », *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), pp. 259–286.
- Vollmer, W., et al., (2008b) 'Peptidoglycan structure and architecture', *FEMS Microbiology Reviews*, 32, pp. 149–167.
- Vötsch, W. and Templin, M. F. (2000) 'Characterization of a β -N-acetylglucosaminidase of Escherichia coli and Elucidation of Its Role in Muropeptide Recycling and β -Lactamase Induction', *Journal of Biological Chemistry*, 275(50), pp. 39032–39038.

- Wachi, M. et al. (1989) 'New mre genes mreC and mreD, responsible for formation of the rod shape of Escherichia coli cells.', *Journal of Bacteriology*, 171(12), pp. 6511 LP – 6516.
- Wagstaff, J. M. et al. (2017) « A polymerization-associated structural switch in *ftsZ* that enables treadmilling of model filaments », *mBio*, 8(3), pp. 1–16.
- Walburger, A., Lazdunski, C. and Corda, Y. (2002) 'The Tol/Pal system function requires an interaction between the C-terminal domain of TolA and the N-terminal domain of TolB', *Molecular Microbiology*, 44(3), pp. 695–708.
- Wang, M. et al. (2019) « Regulation of cytokinesis: *FtsZ* and its accessory proteins », *Current Genetics*, 66(1), pp. 43–49.
- Wang, X., Possoz, C. and Sherratt, D. J. (2005) 'Dancing around the divisome: asymmetric chromosome segregation in Escherichia coli', *Genes & Development*, 19(19), pp. 2367–2377.
- Weadge, J. T. and Clarke, A. J. (2006) 'Identification and characterization of O-acetylpeptidoglycan esterase : a novel enzyme discovered in Neisseria gonorrhoeae', *Biochemistry*, 45(3), pp. 839–851.
- Weadge, J. T., Pfeffer, J. M. and Clarke, A. J. (2005) 'Identification of a new family of enzymes with potential O-acetylpeptidoglycan esterase activity in both Gram-positive and Gram-negative bacteria', *BMC Microbiology*, 5(1), p. 49.
- Weiss, D. S. (2015) 'Last but not least: new insights into how *FtsN* triggers constriction during Escherichia coli cell division', *Molecular Microbiology*, 95(6), pp. 903–909.
- Welsh, M. A. et al. (2019) 'Direction of chain growth and substrate preferences of shape, elongation, division, and sporulation-Family peptidoglycan glycosyltransferases', *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 141(33), pp. 12994–12997.
- Welsh, M. A. et al. (2019) 'Direction of chain growth and substrate preferences of shape, elongation, division, and sporulation-Family peptidoglycan glycosyltransferases', *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 141(33), pp. 12994–12997.
- Welzel, P. (2005) 'Syntheses around the Transglycosylation Step in Peptidoglycan Biosynthesis', *Chemical Reviews*, 105(12), pp. 4610–4660.
- Weston, A. et al. (1981) 'Transformation of Escherichia coli with plasmid deoxyribonucleic acid: calcium-induced binding of deoxyribonucleic acid to whole cells and to isolated membrane fractions', *Journal of bacteriology*, 145(2), pp. 780–787.
- Whatmore, A. M. and Reed, R. H. (1990) 'Determination of turgor pressure in Bacillus subtilis: a possible role for K+ in turgor regulation', *Journal of General Microbiology*, 136(12), pp. 2521–2526.
- White, C. L., Kitich, A. and Gober, J. W. (2010) 'Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD', *Molecular Microbiology*, 76(3), pp. 616–633.
- Wiedemann, I. et al. (2006) 'Lipid II-Based Antimicrobial Activity of the Lantibiotic Plantaricin C', *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), pp. 2809–2814.
- Williams, A. H. et al. (2017) 'Bulgecin a: The key to a broad-spectrum inhibitor that targets lytic transglycosylases', *Antibiotics*, 6(1), pp. 1–14.
- Wilmes, M. et al. (2011) 'Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation', *Natural Product Reports*, 28(8), p. 1350.
- 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*', *Journal of Bacteriology*, 186
- Witty, M. et al. (2002) 'Structure of the periplasmic domain of Pseudomonasaeruginosa TolA: evidence for an evolutionary relationship with the TonB transporter protein', *The EMBO Journal*, 21(16), pp. 4207–4218.
- Wojdyla, J. A. et al. (2015) 'Structure and Function of the Escherichia coli Tol-Pal Stator Protein TolR', *Journal of Biological Chemistry*, 290(44), pp. 26675–26687.
- Woldemeskel, S. A. and Goley, E. D. (2017) 'Shapeshifting to Survive: Shape Determination and Regulation in Caulobacter crescentus', *Trends in microbiology*. 2017/03/27, 25(8), pp. 673–687.

- Wu, F. et al. (2015) « Symmetry and scale orient Min protein patterns in shaped bacterial sculptures », *Nature Nanotechnology*. Nature Publishing Group, 10(8), pp. 1–8.
- Wu, W. et al. (2011) « Determination of the structure of the MinD–ATP complex reveals the orientation of MinD on the membrane and the relative location of the binding sites for MinE and MinC », *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 79(6), pp. 1515–1528.
- Xiao, J. and Goley, E. D. (2016) 'Redefining the roles of the *FtsZ*-ring in bacterial cytokinesis', *Current opinion in microbiology*. 2016/09/10, 34, pp. 90–96.
- Yadav, A. K., Espaillat, A. and Cava, F. (2018) 'Bacterial strategies to preserve cell wall integrity against environmental threats', *Frontiers in Microbiology*, 9(August), pp. 1–9.
- Yahashiri, A., Jorgenson, M. A. and Weiss, D. S. (2017) 'The SPOR domain, a widely conserved peptidoglycan binding domain that targets proteins to the site of cell division', *Journal of Bacteriology*, 199(14), pp. 1–10.
- Yakhnina, A. A. and Bernhardt, T. G. (2020) 'The Tol-Pal system is required for peptidoglycan-cleaving enzymes to complete bacterial cell division', *PNAS*, 117(12), pp. 6777–6783.
- Yang, D. C. et al. (2011) « An ATP-binding cassette transporter-like complex governs cell-wall hydrolysis at the bacterial cytokinetic ring », *PNAS*, 108(45).
- Yang, D. C. et al. (2012) 'A conformational switch controls cell wall-remodelling enzymes required for bacterial cell division', *Molecular Microbiology*, 85(4), pp. 768–781.
- Yang, J.-C. et al. (2004) 'Solution structure and domain architecture of the divisome protein *FtsN*', *Molecular Microbiology*, 52(3), pp. 651–660.
- Yang, S. et al. (2017) « Characterization of C-terminal structure of MinC and its implication in evolution of bacterial cell division », *Scientific reports*. Nature Publishing Group UK, 7(1), p. 7627.
- Yang, X. et al. (2017) 'GTPase activity-coupled treadmilling of the bacterial tubulin *FtsZ* organizes septal cell wall synthesis', *Science*, 355(6326), pp. 744–747.
- Yang, X. et al. (2019) '*FtsW* exhibits distinct processive movements driven by either septal cell wall synthesis or *FtsZ* treadmilling in *E. coli*', *bioRxiv*, p. 850073.
- Yao, Q. et al. (2017) « Short *FtsZ* filaments can drive asymmetric cell envelope constriction at the onset of bacterial cytokinesis », *The EMBO journal*. 2017/04/24. John Wiley and Sons Inc., 36(11), pp. 1577–1589.
- Yao, X. et al. (1999) « Thickness and elasticity of gram-negative murein sacculi measured by atomic force microscopy », *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 181(22), pp. 6865–6875.
- Yeh, Y.-C. et al. (2010) 'The Caulobacter Tol-Pal Complex Is Essential for Outer Membrane Integrity and the Positioning of a Polar Localization Factor', *Journal of Bacteriology*, 192(19), pp. 4847–4858.
- Yoshii, Y., Niki, H. and Shiomi, D. (2019) 'Division-site localization of RodZ is required for efficient Z ring formation in *Escherichia coli*', *Molecular Microbiology*, 111(5), pp. 1229–1244.
- Young, K. D. (2006) 'The Selective Value of Bacterial Shape', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(3), pp. 660 LP – 703.
- Yu, X. C. et al. (1998) 'Localization of cell division protein *FtsK* to the *Escherichia coli* septum and identification of a potential N-terminal targeting domain', *Journal of bacteriology*, 180(5), pp. 1296–1304.
- Yuan, Y. et al. (2007) 'Crystal structure of a peptidoglycan glycosyltransferase suggests a model for processive glycan chain synthesis', *PNAS*, 104(13), pp. 5348 LP – 5353.
- Zapun, A. et al. (2013) « In vitro reconstitution of peptidoglycan assembly from the Gram-Positive pathogen *Streptococcus pneumoniae* », *ACS Chemical Biology*. American Chemical Society, 8(12), pp. 2688–2696.

- Zapun, A., Contreras-Martel, C. and Vernet, T. (2008b) 'Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance', *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), pp. 361–385.
- Zapun, A., Vernet, T. and Pinho, M. G. (2008a) 'The different shapes of cocci', *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), pp. 345–360.
- Zhanell, G. G. et al. (2010) 'New Lipoglycopeptides', *Drugs*, 70(7), pp. 859–886.
- Zhang, X. Y.-Z. et al. (2009) « Mapping the Interactions between Escherichia coli Tol Subunits », *Journal of Biological Chemistry*, 284(7), pp. 4275–4282.
- Zhang, X. Y.-Z. et al. (2011) « Mapping the Interactions between Escherichia coli TolQ Transmembrane Segments », *Journal of Biological Chemistry*, 286(13), pp. 11756–11764.
- Zheng, S. et al. (2018) « Structure and mutagenic analysis of the lipid II flippase MurJ from Escherichia coli », *PNAS*, 115(26), pp. 6709–6714.
- Zhou, H. et al. (2005) 'Analysis of MinD Mutations Reveals Residues Required for MinE Stimulation of the MinD ATPase and Residues Required for MinC Interaction', *Journal of Bacteriology*, 187(2), pp. 629 LP – 638.
- Zou, Y., Li, Y. and Dillon, J.-A. R. (2017) 'The distinctive cell division interactome of Neisseria gonorrhoeae', *BMC Microbiology*, 17(1), p. 232.
- Zuegg, J. et al. (2015) 'Carbohydrate scaffolds as glycosyltransferase inhibitors with *in vivo* antibacterial activity', *Nature Communications*, 6(1), p. 7719.
- Zupan, J. R. et al. (2013) « Dynamic *FtsA* and *FtsZ* localization and outer membrane alterations during polar growth and cell division in *Agrobacterium tumefaciens* », *PNAS*, 110(22), pp. 9060–9065.

VII. Publications

Publication 1

Regulation of the Peptidoglycan Polymerase Activity of PBP1b by Antagonist Actions of the Core Divisome Proteins FtsBLQ and FtsN

Adrien Boes,^a Samir Olatunji,^a Eefjan Breukink,^b Mohammed Terrak^a

^aInBioS-Centre d'Ingénierie des Protéines, Liège University, Liège, Belgium

^bMembrane Biochemistry and Biophysics, Department of Chemistry, Faculty of Science, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

ABSTRACT Peptidoglycan (PG) is an essential constituent of the bacterial cell wall. During cell division, PG synthesis localizes at midcell under the control of a multi-protein complex, the divisome, allowing the safe formation of two new cell poles and separation of daughter cells. Genetic studies in *Escherichia coli* pointed out that FtsBLQ and FtsN participate in the regulation of septal PG (sPG) synthesis; however, the underlying molecular mechanisms remained largely unknown. Here we show that FtsBLQ subcomplex directly interacts with the PG synthase PBP1b and with the subcomplex FtsW-PBP3, mainly via FtsW. Strikingly, we discovered that FtsBLQ inhibits the glycosyltransferase activity of PBP1b and that this inhibition was antagonized by the PBP1b activators FtsN and LpoB. The same results were obtained in the presence of FtsW-PBP3. Moreover, using a simple thioester substrate (S2d), we showed that FtsBLQ also inhibits the transpeptidase domain of PBP3 but not of PBP1b. As the glycosyltransferase and transpeptidase activities of PBP1b are coupled and PBP3 activity requires nascent PG substrate, the results suggest that PBP1b inhibition by FtsBLQ will block sPG synthesis by these enzymes, thus maintaining cell division as repressed until the maturation of the divisome is signaled by the accumulation of FtsN, which triggers sPG synthesis and the initiation of cell constriction. These results confirm that PBP1b plays an important role in *E. coli* cell division and shed light on the specific role of FtsN, which seems to counterbalance the inhibitory effect of FtsBLQ to restore PBP1b activity.

IMPORTANCE Bacterial cell division is governed by a multiprotein complex called divisome, which facilitates a precise cell wall synthesis at midcell and daughter cell separation. Protein-protein interactions and activity studies using different combinations of the septum synthesis core of the divisome revealed that the glycosyltransferase activity of PBP1b is repressed by FtsBLQ and that the presence of FtsN or LpoB suppresses this inhibition. Moreover, FtsBLQ also inhibits the PBP3 activity on thioester substrate. These results provide enzymatic evidence of the regulation of the peptidoglycan synthase PBP1b and PBP3 within the divisome. The results confirm that PBP1b plays an important role in *E. coli* cell division and shed light on the specific role of FtsN, which functions to relieve the repression on PBP1b by FtsBLQ and to initiate septal peptidoglycan synthesis.

KEYWORDS divisome, FtsBLQ, FtsN, lipid II, PBP1b, peptidoglycan

P peptidoglycan (PG) is the major constituent of the bacterial cell wall; it surrounds the cytoplasmic membrane, determines the cell shape, and protects the cell from rupture under its internal osmotic pressure. PG polymerization starts with the lipid II precursor, which is synthesized on the inner face of the cytoplasmic membrane and subsequently needs to be translocated through this membrane by MurJ flippase (1).

Citation Boes A, Olatunji S, Breukink E, Terrak M. 2019. Regulation of the peptidoglycan polymerase activity of PBP1b by antagonist actions of the core divisome proteins FtsBLQ and FtsN. *mBio* 10:e01912-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01912-18>.

Invited Editor Tanneke den Blaauwen, University of Amsterdam

Editor Nina R. Salama, Fred Hutchinson Cancer Research Center

Copyright ©2019 Boes et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](#).

Address correspondence to Mohammed Terrak. mterrak@ulieae.be.

FtsW of the SEDS (shape, elongation, division, and sporulation) protein family was also proposed previously as a lipid II flippase (2), and a new study proposes that both FtsW and MurJ are required for lipid II transport (3). Once on the periplasmic side of the membrane, lipid II is polymerized by the glycosyltransferase (GTase) activities of the class A PBPs (aPBPs) and SEDS proteins and the transpeptidase (TPase) activities of aPBPs and class B PBPs (bPBPs) (4–8). Inhibition of either aPBPs or rod system (SEDS) reduces PG synthesis by about 80%, indicating that both synthase systems are required for optimal cell wall assembly and may collaborate (9).

For the safe growth and division of the bacterial cell, PG synthesis and also hydrolysis proceed without compromising the integrity of the cell, thanks to the precise coordination and the tight regulation of the enzymes within multiprotein complexes, the elongasome and the divisome, respectively, active in cell elongation and division (10–12). The divisome governs septal PG (sPG) synthesis, cell envelope constriction, and cell separation at midcell (13, 14). In *Escherichia coli*, this dynamic machinery includes more than 20 essential and accessory proteins which assemble in an ordered and interdependent manner in two steps (15); first, the tubulin-like FtsZ, ZipA, FtsA, ZapA to -E, and FtsEX localize at midcell in contact with the inner face of the cytoplasmic membrane. Later, the downstream components FtsK, FtsB-FtsL-FtsQ, FtsW-FtsI (PBP₃), and FtsN join sequentially, and FtsQLQ and FtsW-PBP₃ localize as preformed subcomplexes (16, 17), to complete the assembly of the mature divisome (18, 19). In addition, other proteins such as the PG synthase PBP1b and proteins that regulate its activities (LpoB, CpoB, and TolA) also associate with the divisome (13, 20). PBP1b (aPBP) is a bifunctional GTase/TPase enzyme responsible for both glycan chain polymerization and peptide cross-linking of the PG, respectively (21, 22). Its activity is stimulated by FtsN and the outer membrane (OM) lipoprotein LpoB; the latter binds to the UB₂H domain of PBP1b (23–26). In *E. coli*, PBP1b requires FtsW and PBP₃ for septal localization (13, 20), and the three proteins were shown to form a ternary complex (27), the septal synthase subcomplex of the divisome. Several studies have shown interactions between the components of this subcomplex and FtsN and FtsBLQ subunits (10, 17, 26, 28–32). FtsW is a polytopic membrane protein that plays an essential role in cell division. We have shown that FtsW directly interacts with lipid II and that PBP₃ regulates this interaction and the availability of the substrate for the PBP1b synthase (27), but the GTase activity was not detected with three different FtsW proteins or the *E. coli* FtsW-PBP₃ complex (27). Recently, FtsWs from different bacteria have been shown to polymerize lipid II into PG in a bPBP-dependent manner (6). PBP₃ (bPBP) is a monofunctional TPase specific and essential for septal PG synthesis and cell constriction (33, 34); its activity requires prior glycan chain elongation by a GTase. *Streptococcus thermophilus* PBP2x was able to cross-link glycan chain provided by its cognate FtsW and noncognate aPBP (whose TPase was inactivated) and a monofunctional GTase (6), suggesting that *E. coli* PBP₃ may also use the glycan substrate formed by PBP1b and FtsW.

Homologues of FtsBLQ are genetically well conserved among bacterial species and are absent from bacteria without a cell wall (35, 36). In *E. coli*, soluble constructs of FtsBLQ form a ternary complex in a 1:1:1 stoichiometry (37); however, the membrane forms of FtsBL were shown to assemble as an L₂B₂ tetramer (38). FtsB, FtsL, and FtsQ are bitopic membrane proteins of 103, 121, and 276 residues, respectively, composed of a short N-terminal cytoplasmic sequence, a transmembrane segment, and a periplasmic domain (35, 39). The latter is divided into two subdomains in FtsQ, the α- and β-domains. The α-domain with a polypeptide transport-associated (POTRA) fold was shown to be involved in transient protein-protein interactions (40). The β-domain interacts with many divisome proteins, including FtsB/FtsL. The last C-terminal 30 amino acids are not structured and play an important role in the interaction with FtsB/L. FtsBLQ are essential proteins of the divisome; they were long believed to have a scaffolding function (35, 39), and only recently an active role in the regulation of septal PG synthesis was attributed to this protein complex in coordination with FtsA and FtsN (41, 42).

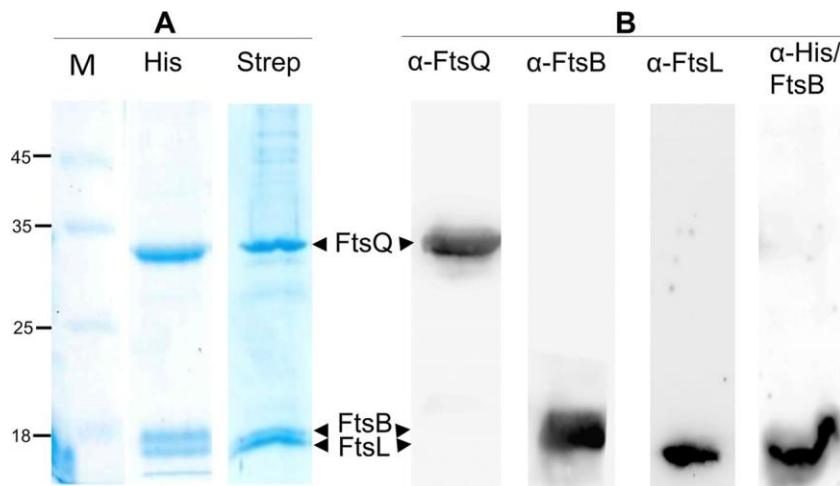


FIG 1 Purification of the FtsBLQ ternary complex and Western blot analysis. (A) SDS-PAGE analysis of HisFtsBLQ and StrepFtsBLQ complexes purified on HisTrap (His) or StrepTrap (Strep), respectively. Numbers at left are molecular masses in kilodaltons. (B) Western blot analyses performed on HisFtsBLQ complex purified on HisTrap using specific antibodies against each protein and anti-His antibody for His-FtsB.

Mutations in FtsB or FtsL lead to premature initiation of constriction, and the mutants completely or partially bypass the need for FtsN, FtsK, ZipA, and FtsA.

FtsN is a bitopic membrane protein composed of a small cytoplasmic domain that interacts with FtsA at the α C subdomain, a transmembrane α -helix, and a large periplasmic domain (43, 44). The latter is divided into three subdomains, including a membrane-proximal portion containing three short α -helices; the region located around α -helix 2 (L₇₅ to Q₉₄, $^{\text{E}}\text{FtsN}$) is essential for the function of the protein (41, 45), and it is followed by a glutamine-rich central region and a PG binding SPOR domain at the C terminus which binds preferentially to glycan chains devoid of stem peptides (46–48). FtsN is the last essential protein to localize at the division site; its accumulation using a positive feedback mechanism completes the maturation of the divisome and triggers the initiation of cell envelope constriction (45).

In this work, we have investigated the role of the complex FtsBLQ in peptidoglycan synthesis *in vitro* and the coordination of its activity with that of FtsN. We first analyzed the interactions of FtsBLQ and FtsN with each other and with the synthase subcomplex components PBP1b-FtsW-PBP3. We then studied the effect of the observed interactions on the synthase activity of PBP1b with the lipid II substrate. Remarkably, we found that the complex FtsBLQ inhibits the GTase activity of PBP1b alone or in the presence of FtsW-PBP3 and that this inhibition is antagonized by FtsN or LpoB to restore PBP1b activity. Interestingly, using a thioester substrate, we showed that FtsBLQ also inhibits PBP3 activity. These results provide enzymatic evidence of the regulation of the PG synthase PBP1b and PBP3 within the divisome.

RESULTS

Expression and purification of the FtsBLQ complex. The full-length membrane forms of FtsB, FtsL, and FtsQ were coexpressed from one Duet plasmid in *E. coli* membranes, solubilized with DDM detergent, and copurified by affinity chromatography using a His tag (His) or a Strep tag at the N terminus of FtsB; the untagged FtsL and FtsQ coeluted with tagged FtsB, indicating the formation of a stable trimeric complex as expected from previous studies (Fig. 1A) (16). The presence and the identity of the three proteins in the purified complex were verified using specific antibodies against each one of them and anti-His antibodies for His-FtsB. The results show a single band with the expected molecular mass corresponding to His-FtsB, FtsL, and FtsQ (Fig. 1B). We then set out to study the interaction between FtsBLQ, FtsW and/or PBP₃, PBP_{1b}, and FtsN (only one protein that contained a His or Strep tag was used as a bait) by performing several coexpressions from compatible Duet vectors in *E. coli*, followed by the extraction of multiprotein complexes from the bacterial membranes using detergent and affinity copurification on a HisTrap or StrepTrap column. The proteins recovered were then labeled with fluorescent ampicillin, when PBPs were present, and analyzed by SDS-PAGE followed by fluorescence imaging and protein staining (Fig. 2). In all cases, we confirmed that the preys (nontagged or containing a different tag not compatible with the column used) do not bind to the column matrix.

FtsBLQ interacts with FtsW/PBP₃ and PBP_{1b} but not with FtsN. In the first coexpression experiment, we used HisFtsW/PBP₃ and StrepFtsBLQ constructs (Strep tag on FtsB and His on FtsW and vice versa); the copurification results on a Ni column in both cases showed that FtsW/PBP₃ and FtsBLQ coeluted, indicating an interaction between the two subcomplexes (Fig. 2A and data not shown). The quality of the purification using Strep tag was less efficient (most of the Strep-tagged protein was found in the flowthrough), and we used only His tag and the Ni-affinity column in subsequent experiments. When HisFtsBLQ was coexpressed with untagged FtsW or PBP₃ separately, FtsW was found in the elution fraction (Fig. 2B), but most of PBP₃ was recovered in the washing step, and only a small amount of PBP₃ was retained by FtsBLQ (Fig. 2D). A larger amount of PBP₃ coeluted with FtsBLQ when FtsW was also present, and even if PBP₃ was not overexpressed, the endogenous PBP₃ was copurified with FtsBLQ-FtsW (Fig. 2B). These results show that FtsBLQ directly interacts with FtsW with higher affinity than with PBP₃, suggesting that the interaction of PBP₃ with FtsBLQ is mainly mediated by FtsW. The results also indicate that the binding sites of FtsBLQ and PBP₃ on FtsW are distinct. In contrast to FtsW, the mutant FtsW_{HA} (FtsW with the HA epitope inserted in the periplasmic loop between TM helices 7 and 8) was not coeluted with FtsBLQ (Fig. 2C), showing that the interaction between FtsBLQ and FtsW wild type is specific and that the large FtsW loop 7/8 plays a role in the binding. By coexpressing HisFtsBLQ and PBP_{1b}, we found that the untagged PBP_{1b} (and endogenous PBP₃) coeluted with HisFtsBLQ, showing that PBP_{1b} interacts with the FtsBLQ complex (Fig. 2F). Similarly, the coexpression of HisFtsW/PBP_{1b} and StrepFtsBLQ allowed the isolation of a six-protein complex which included the endogenous PBP₃ (Fig. 2E), indicating simultaneous interaction between these proteins and that their binding sites are not overlapping. On the other hand, when the subunit HisFtsBL or HisFtsQ was coexpressed with PBP_{1b}, the complexes FtsBL-PBP_{1b} and FtsQ-PBP_{1b} were formed, respectively, but a larger amount of PBP_{1b} was coeluted with FtsBL than with FtsQ, suggesting that these FtsBLQ subunits interact directly with PBP_{1b}, and the binding with FtsBL seemed higher than with FtsQ (Fig. 2G and H). Interestingly, while PBP₃ coeluted with FtsBLQ-PBP_{1b}, it was not present with FtsBL-PBP_{1b} or FtsQ-PBP_{1b}. This result excludes the possibility of PBP₃ playing an intermediary role in the interaction between FtsBLQ and PBP_{1b}.

FtsN was shown to interact with PBP1b and to stimulate its activity (26), and it was also suggested that FtsN regulates septal synthesis via FtsBLQ (41). Here we have confirmed the interaction between FtsN and PBP1b (Fig. 2I), but only a negligible amount of FtsN was copurified with HisFtsBLQ, and the bulk of the protein was present in the flowthrough and wash fractions (Fig. 2J). In contrast, a significant amount of FtsN was retained by HisFtsW (Fig. 2K). These results suggest that FtsN does not interact directly with or binds only weakly to the FtsBLQ subcomplex as observed previously (28, 31), but both FtsN and FtsBLQ seem to interact independently with the synthase subcomplex components FtsW-PBP3-PBP1b, confirming the presence of a large and dynamic divisome assembly. We then addressed the question of the significance of these interactions for the PBP synthase activities and regulation.

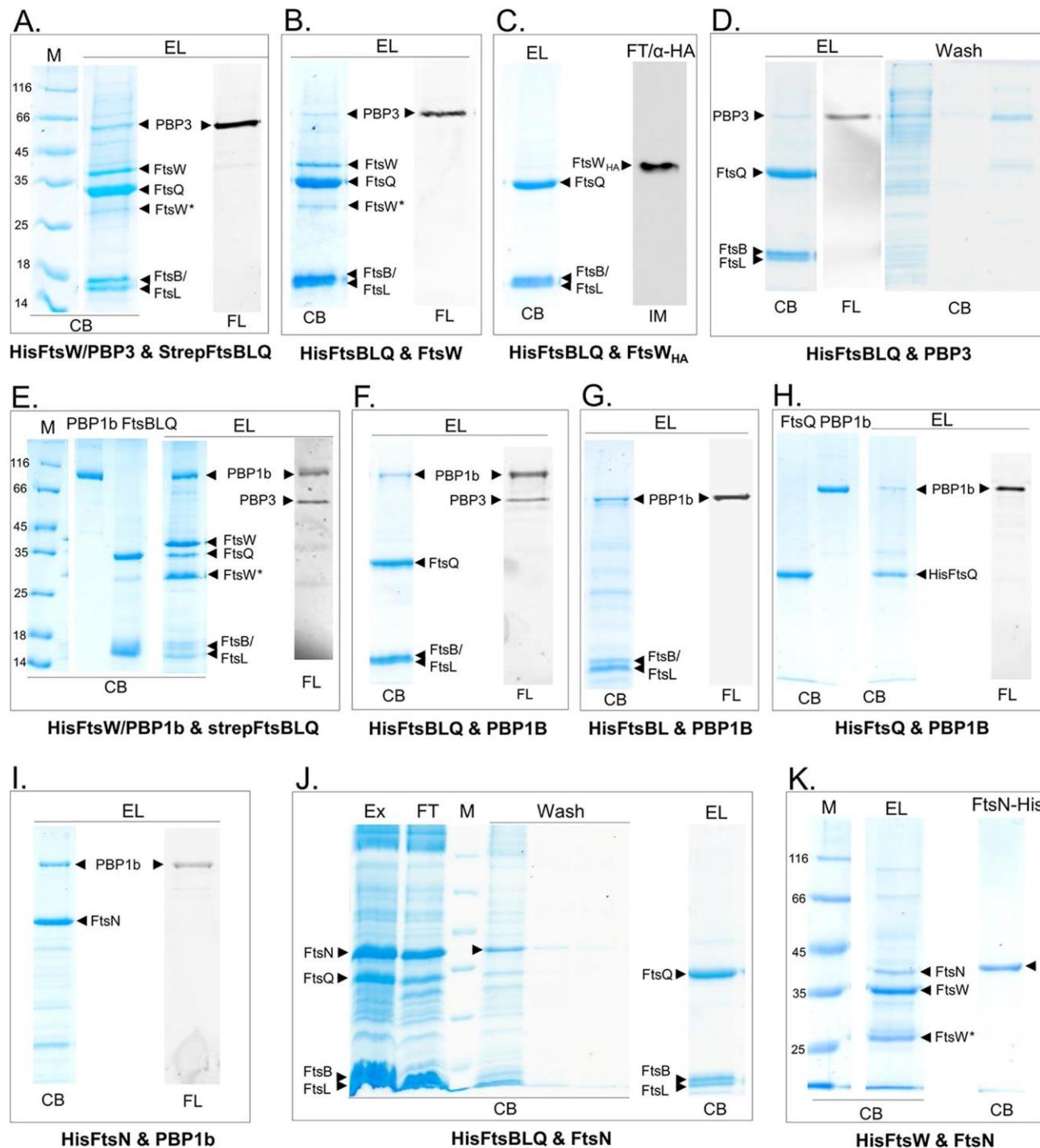


FIG 2 Protein-protein interactions using coexpression and copurification. The proteins indicated below each panel (A to K) were coexpressed in *E. coli* and copurified on a nickel column using one (His)-tagged protein as a bait. The eluted proteins were then labeled with fluorescent ampicillin, when PBPs were present, and analyzed by SDS-PAGE followed by fluorescence (FL) imaging and protein staining with Coomassie blue (CB). M, protein standard; EL, elution fractions from Ni affinity column; FL, fluorescently labeled PBPs; Ex, protein extracts; FT, indicates the flowthrough fractions. The bands of the proteins are indicated by arrowheads. FtsW* is a degradation product of FtsW. α -HA indicates immunoblotting (IM) analysis using antibodies against the HA epitope of FtsW_{HA}. Numbers at left of panels are molecular masses in kilodaltons.

Antagonist actions of FtsBLQ and FtsN on PBP1b activity. It was suggested that both FtsBLQ and FtsN participate in the regulation of septal peptidoglycan synthesis and the initiation of cell constriction (41), but the specific target of FtsBLQ and the molecular mechanisms were not identified. FtsN is known to interact with PBP1b (confirmed above) and to stimulate its activity, and we showed above that FtsBLQ also interacts with PBP1b. To understand the effects of these interactions on the enzymatic activity of PBP1b, we monitored its polymerase reaction by continuous fluorescence assay in the presence of FtsBLQ and/or FtsN using dansyl-lipid II as the substrate (49). This was first tested using the well-known PBP1b activators FtsN and LpoB. As expected, these two proteins stimulated the activity of PBP1b (Fig. 3B and C). We then tested the effect of the purified FtsBLQ subcomplex on the activity of PBP1b. Strikingly, we discovered that the addition of FtsBLQ inhibits the GTase activity of PBP1b in a concentration-dependent manner (Fig. 3A). This effect was confirmed using a second assay with radiolabeled lipid II and visualization of the reaction products (Fig. 4). This finding reveals for the first time the role of FtsBLQ as a negative regulator of the PBP1b synthase. Interestingly, we also found that the inhibitory effect of FtsBLQ on the activity of PBP1b can be relieved in the presence of FtsN (Fig. 3B) or LpoB (Fig. 3C). As PBP1b interacts with FtsW/PBP3, the same experiments were then performed in the presence of FtsW/PBP3 to test the combined effect of the interacting subcomplexes. Here also, we found that FtsBLQ represses the polymerase activity of PBP1b and that FtsN or LpoB allows its recovery in this environment, mimicking the enzymatic core of the divisome (Fig. 3D and E). The activation of PBP1b by FtsN or LpoB in the presence of FtsW/PBP3 was equally maintained (Fig. 3F and G). These results are well in line with the published *in vivo* data showing that for *E. coli* to survive in the absence of FtsN, suppressor mutations in FtsB or FtsL were also required (41). We conclude that the subcomplex FtsBLQ interacts with the sPG synthase subcomplex PBP1b-FtsW-PBP3 and maintains the activity of PBP1b as repressed until the arrival of FtsN, which triggers sPG synthesis and constriction of the bacterial cell.

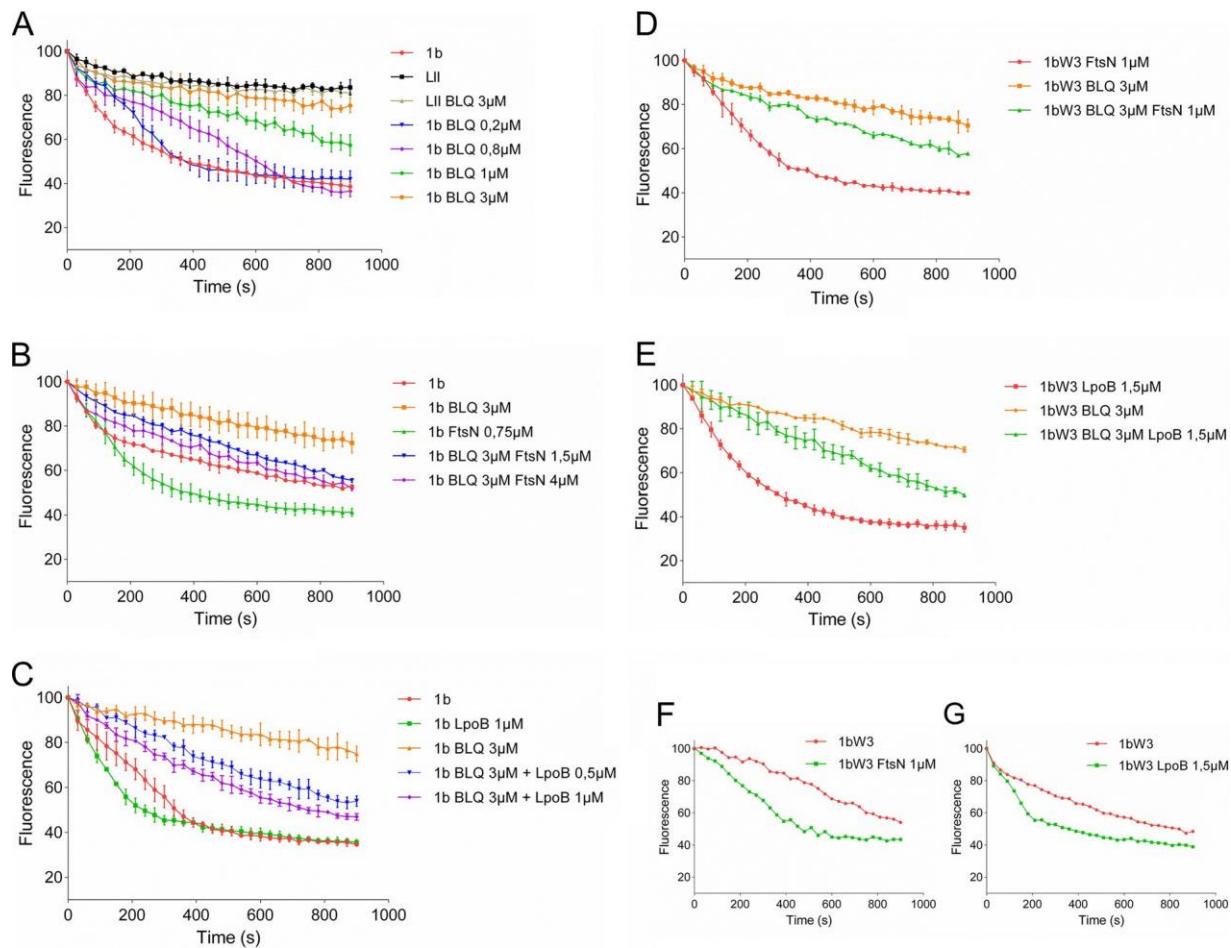


FIG 3 Effect of FtsBLQ and/or FtsN or LpoB on the activity of PBP1b in the presence and absence of FtsW/PBP3. The GTase activity of PBP1b with dansyl-lipid II is measured using a continuous fluorescence assay (the concentrations of PBP1b and other proteins and detergent concentrations were optimized for each experiment). Upon PG polymerization, the fluorescence decreases over time. Values are the mean \pm SD from three experiments or a representative of three assays. (A) Inhibition of lipid II (LII) polymerization by PBP1b (1b) using variable concentrations of FtsBLQ (BLQ) subcomplex. (B and C) FtsN or LpoB, respectively, suppresses the inhibitory effect of FtsBLQ on PBP1b. (D and E) FtsN or LpoB, respectively, suppresses the inhibitory effect of FtsBLQ on PBP1b in the presence of FtsW/PBP3 (1bW3). (F and G) Activation of PBP1b by FtsN or LpoB, respectively, in the presence of FtsW/PBP3.

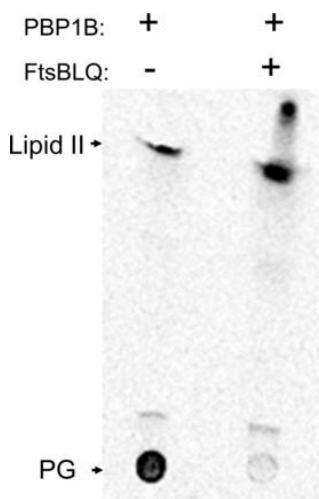


FIG 4 Inhibition of PBP1b GTase activity by FtsBLQ. TLC analysis of the reaction products formed by PBP1b from radioactive lipid II substrate. The addition of FtsBLQ in the PBP1b reaction mixture inhibits the polymerization of lipid II into PG polymer.

The FtsBL subunit inhibits PBP1b activity. To better understand the mechanism of PBP1b inhibition by the FtsBLQ complex, subunits have been purified and tested. As FtsB and FtsL have been shown to be dependent on each other for stability, proper cellular localization, and function (39, 50), we compared the effect of the ternary subcomplex with that of the FtsBL dimer and FtsQ, which have been shown earlier to interact with PBP1b. We found that while FtsQ has no effect on the polymerase activity of PBP1b (Fig. 5A), the FtsBL dimer, in contrast, without detectable FtsQ by immuno- blotting (see Fig. S1 in the supplemental material), exhibited high inhibition activity approaching that of the FtsBLQ subcomplex (Fig. 5B). These results indicate that FtsBL represents the main inhibitory factor of PBP1b while FtsQ is not directly involved in the inhibition. This is consistent with the finding that suppressor mutations that bypass FtsN were located in FtsB and FtsL and not in FtsQ (41).

The mutation FtsL^{D93A} decreases the inhibition of PBP1b by FtsBL^{D93A}Q subcomplex. FtsN-suppressor mutations located in the so-called constriction control domains (CCDs) of FtsB (A55 to D59) and FtsL (E88 to H94) have been shown to restore bacterial division in the absence of FtsN (41). This suggests that FtsBLQ complexes harboring these mutations are not functional, and in light of our results, we hypothesized that they might not inhibit PBP1b and thus no reactivation by FtsN would be needed. To test this hypothesis, FtsBLQ subcomplexes containing the single mutation FtsB^{E56A}, FtsB^{E56K}, FtsB^{D59H}, or FtsL^{D93A} were purified and tested for their effect on PBP1b. All purified subcomplex variants were undistinguishable from that without these mutations in terms of expression level and complex recovery, indicating that these mutations did not affect the stability or dissociate the subcomplex (Fig. S2). Interestingly, we found that the inhibitory effect of the FtsBL^{D93A}Q mutant decreased significantly compared to the control reaction (Fig. 5C). In contrast, the effects of FtsBLQ subcomplexes harboring FtsB^{E56A}, FtsB^{E56K}, or FtsB^{D59H} on the activity of PBP1b were comparable to those of FtsBLQ without these mutations (Fig. 5F and Fig. S3). These results suggest that FtsL is the specific inhibitor of the PBP1b GTase activity, with residue D93 playing an essential role in this process, and that FtsB plays a distinct role as proposed previously (41). Interestingly, induction of the expression of FtsBLQ results in long filaments, indicating an inhibition of cell division, while the cells producing FtsBLQ containing the FtsB^{E56A}, FtsB^{E56K}, FtsB^{D59H}, or FtsL^{D93A} mutations exhibit cell length and width comparable to those before induction (Fig. 6), suggesting that these mutants are functionally inactive *in vivo*.

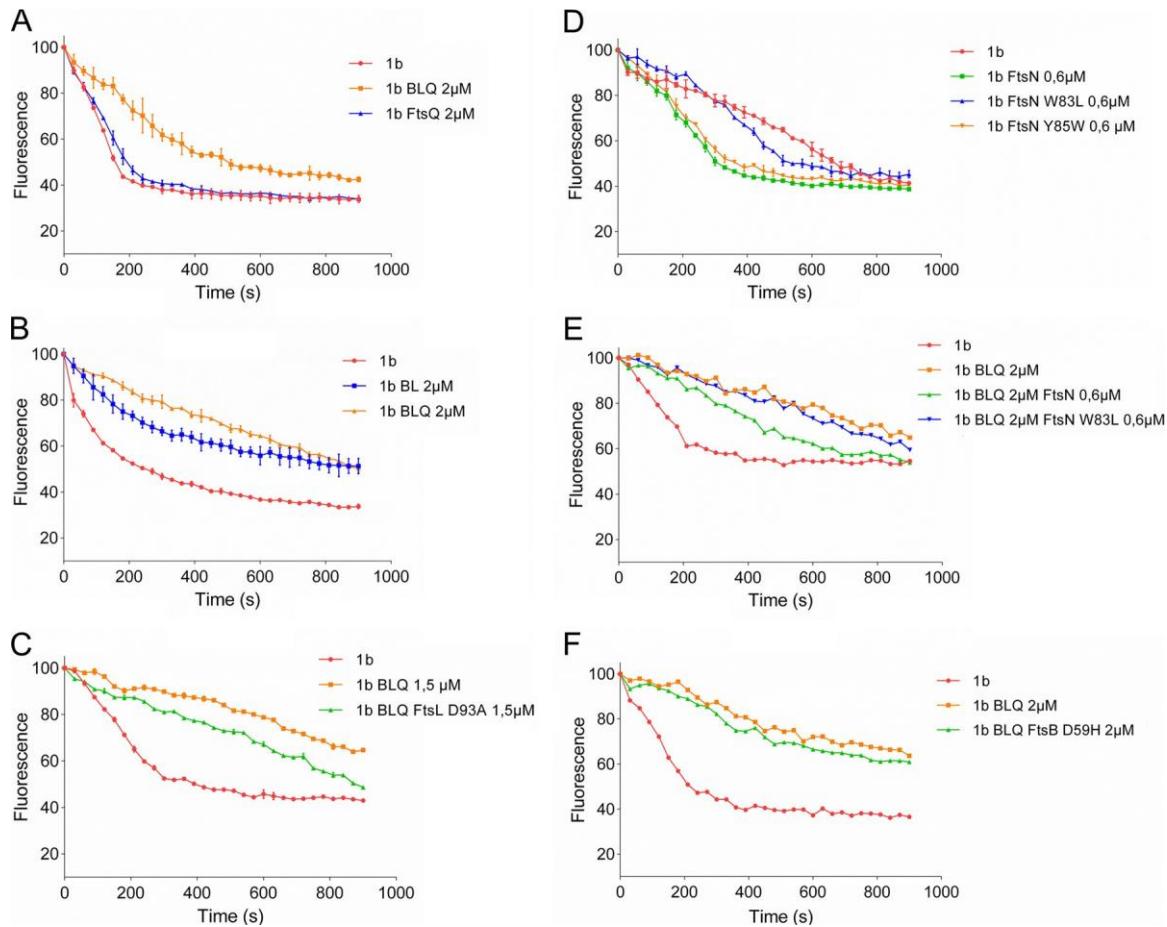


FIG 5 Effect of FtsBLQ subunits and mutants and FtsN mutants on the activity of PBP1b. The GTase activity of PBP1b was measured by continuous fluorescence assay (the concentration of PBP1b and other proteins and detergent concentration were optimized for each experiment). (A and B) Comparison of the effects of FtsBLQ with the subunit FtsQ or FtsBL, respectively, on the activity of PBP1b. (C) Comparison of the effect of FtsBLQ containing the mutation $\text{FtsL}^{\text{D93A}}$ and control complex on the activity of PBP1b. (D) Comparison of the effects of the $\text{FtsN}^{\text{W83L}}$ and $\text{FtsN}^{\text{Y85W}}$ mutants and wild-type FtsN on the activity of PBP1b. (E) Comparison of the effects of FtsN and $\text{FtsN}^{\text{W83L}}$ mutant on PBP1b inhibited by FtsBLQ. (F) Effect of FtsBLQ containing the mutation $\text{FtsB}^{\text{D59H}}$ on the activity of PBP1b.

The $\text{FtsN}^{\text{W83L}}$ mutant is less efficient in the stimulation of PBP1b activity. The essential region of FtsN (^FtsN) required for the activation of sPG synthesis and cell constriction was delimited in the sequence L₇₅ to Q₉₃; within this region, three residues (W₈₃, Y₈₅, and L₈₉) have been shown to be crucial for this activity (41). In order to establish the link between the ^FtsN region and PBP1b function, we have expressed and purified $\text{FtsN}^{\text{Y85W}}$ and $\text{FtsN}^{\text{W83L}}$ (nonpermissible mutations *in vivo*) and tested their effect on the GTase activity of PBP1b. The expression level and stability of the two mutants were similar to those of the wild type. We found that while the $\text{FtsN}^{\text{Y85W}}$ mutant had an activating effect on PBP1b similar to that of the wild-type protein, the $\text{FtsN}^{\text{W83L}}$ mutant was much less efficient in the stimulation of PBP1b activity (2-fold decrease in initial velocity) (Fig. 5D) and $\text{FtsN}^{\text{W83L}}$ was unable to relieve the inhibition of PBP1b by FtsBLQ (Fig. 5E). Interestingly, analysis of the copurified PBP1b-FtsN and PBP1b- $\text{FtsN}^{\text{W83L}}$ complexes by gel filtration showed that the W_{83L} mutation decreases the interaction of FtsN with PBP1b. Indeed, the PBP1b/FtsN ratio was approximatively 20/80 with $\text{FtsN}^{\text{W83L}}$ and 40/60 with FtsN^{WT} (Fig. S4). These results indicate that the ^FtsN (L₇₅ to Q₉₃) region is directly involved in the interaction and activation of PBP1b.

FtsBLQ inhibits the activity of PBP3 on a thioester substrate. The purified *E. coli* PBP3 is able to bind penicillin and to catalyze the hydrolysis or aminolysis of simple thioester substrates, indicating that the active site is correctly folded and functional (51); in contrast, its TPase activity with the natural substrate has never been reported. In the absence of a TPase assay for PBP3 with its native substrate, we used an assay based on the thioester substrate S2d to assess the effect of FtsBLQ and mutants on its activity and that of PBP1b (52). We found that FtsBLQ inhibits the hydrolysis of S2d by PBP3 (Fig. 7A) but, in contrast, has no significant effect on the similar reaction catalyzed by the TPase domain of PBP1b (Fig. 7B). Interestingly, when FtsQ and FtsBL were added separately to the reaction, the activity of PBP3 was inhibited by FtsQ but FtsBL had only a minor effect (Fig. 7C), contrasting with the opposite effects of these subunits on the GTase activity of PBP1b. Aztreonam used as a control inhibited PBP3 as expected, and FtsBLQ or subunits had no effect on the substrate in the absence of the enzyme (Fig. 7 and Fig. S5). These results are consistent with the finding that the pneumococcal DivIB-DivIC-FtsL and DivIB (ortholog of *E. coli* FtsQ) were also able to decrease the activity of PBP2x (ortholog of *E. coli* PBP3) on S2d (53). Moreover, the observations that a region in the beta domain (residues 229 to 257) of DivIB of *B. subtilis* is critical for the interaction with PBP2B (ortholog of *E. coli* PBP3) (54) and that the A252P mutation in the corresponding region of *E. coli* FtsQ was found to abolish the capacity of FtsQ to recruit PBP3 strongly support our findings (55).

As the FtsB mutants (FtsB^{E56A}, FtsB^{E56K}, or FtsB^{D59H}) did not affect the activity of the FtsBLQ subcomplex toward the GTase activity of PBP1b, we tested their effect on PBP3, but no change was observed (data not shown). FtsN also has no effect on the activity of PBP3 on S2d (data not shown and Fig. S5).

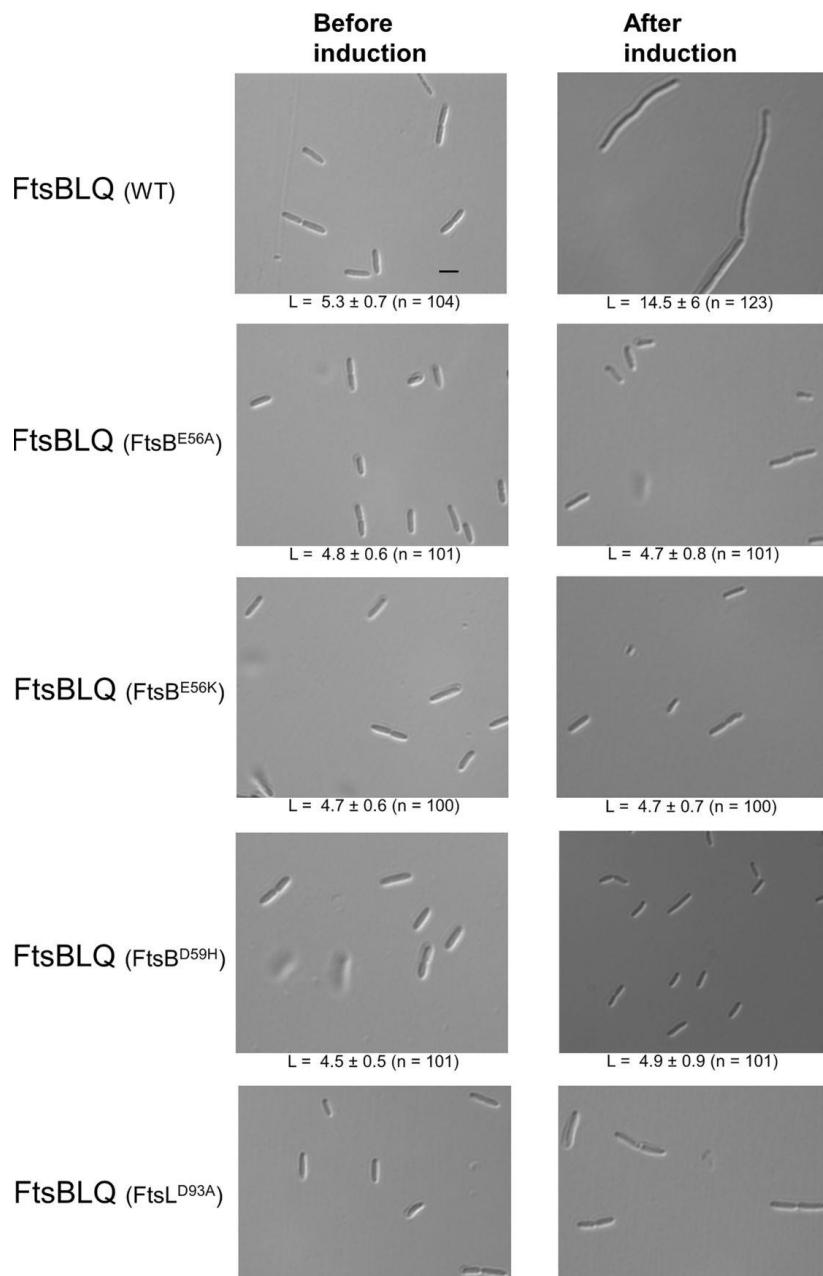


FIG 6 Phenotype of *E. coli* cells (C43 DE3) overexpressing FtsBLQ complex or mutants. FtsBLQ (WT) induces extensive cell filamentation after induction, while the cells overproducing FtsBLQ complexes with a mutation in FtsB or FtsL exhibit comparable cell length before and after induction. The average cell length ($L \pm SD \text{ } (\mu\text{m})$) and the number of cells measured (n) are shown below the corresponding representative image. The average cell width in all cases was $\sim 1.3 \mu\text{m}$. Bar, $5 \mu\text{m}$.

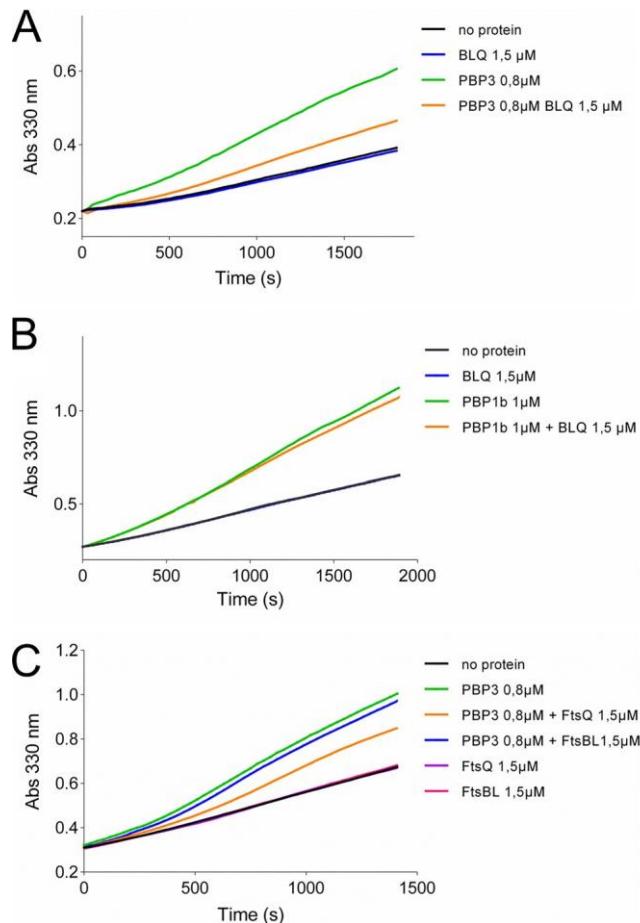


FIG 7 Effect of FtsBLQ and subunits on the hydrolysis of S2d by PBP3 and PBP1b TPase domain. (A) Inhibition of PBP3 activity by FtsBLQ. (B) FtsBLQ does not inhibit the hydrolysis of S2d by PBP1b TPase domain. (C) Hydrolysis of S2d by PBP3 is inhibited by FtsQ but not by FtsBL. Abs 330 nm, absorbance at 330 nm.

DISCUSSION

How bacteria (*E. coli*) regulate cell division is a fundamental question. The large majority of proteins involved in cell division and that collectively form the divisome have been identified and characterized. However, the molecular mechanisms and the function of many of them remain unsolved. Initially, the FtsBLQ complex has been thought to play a scaffolding function (35, 39), but this has changed recently when suppressor mutations in FtsB or FtsL were found to completely bypass the need for FtsN, FtsA, and other divisome proteins (41, 42), suggesting an active role of FtsBLQ in the regulation of cell wall synthesis during division in coordination with FtsA and FtsN.

sPG synthesis relies on both glycan chain syntheses by the GTases (aPBP belonging to the GTase 51 family and the proteins of the SEDS family) and their cross-linking by the TPase activities of the PBPs to drive cell division. During elongation, both aPBPs and RodA have been shown to be essential for PG polymerization, as the inhibition of one of them drastically reduces cell wall synthesis (9, 56). This indicates that PBP1b and FtsW/PBP3 may also collaborate to synthesize functional sPG.

In *E. coli*, at least one class A PBP (PBP1a or PBP1b) is required for viability (57); although the two PBPs are exchangeable, they likely have a specific function during the cell cycle, with PBP1b exhibiting a preference for cell division (58, 59) and a clear enrichment at midcell during cell constriction, which overlap the localization of FtsN and LpoB (13, 20, 60). In the absence of PBP1b, the localization of PBP1a at midcell was shown to increase (61). In addition, it has been shown that elongasome and divisome proteins are simultaneously present at midcell for about 40% of the division cycle time (62). These observations indicate that PBP1a would take over the role of PBP1b in cell division; however, the exact mechanisms of recruitment and regulation are unknown. Despite a compelling body of evidence linking PBP1b with cell division (10, 13, 20, 26, 27, 58–61), its exact role in this process and its regulation were overlooked. Enzymatic evidence for the positive regulation of the polymerase activity of PBP1b by the core division protein FtsN and the lipoprotein LpoB is well characterized (23, 24, 26, 63). However, while PBP1b localizes most likely with FtsW and PBP3 (20), sPG synthesis starts after FtsN accumulation to the septum, suggesting that the polymerase activity of PBP1b must also be negatively regulated.

Knowing the high activity and processivity of PBP1b *in vitro* (which are probably more impressive *in vivo*), and the restricted space at the constriction site, a small amount of PBP1b would be sufficient to drive sPG synthesis (21, 22, 64). At the division site, the copy number of PBP1b was estimated at ~18 and that of FtsBLQ complexes at ~20 to 66 copies per cell (60, 65). Thus, the low copy number of PBP1b at the division site is compatible with a localized regulation of its activity by the FtsBLQ complex. The cellular concentration of FtsN increases during the cell cycle by 30% to reach a maximum of ~150 molecules per cell (60), which is ~8 times higher than FtsBLQ and PBP1b, allowing it to efficiently compete for binding to PBP1b and trigger sPG synthesis and cell constriction.

Published data and our interaction experiments have shown multiple oligomeric interactions between FtsBLQ, FtsW/PBP3, PBP1b, and FtsN (10, 17, 26–32, 66). We refer to this group of proteins as the septum synthesis core of the divisome, composed of the synthase subcomplex (FtsW-PBP3-PBP1b) and the regulatory elements FtsBLQ and FtsN (and others such as LpoB and CpoB). Except from FtsW, the observed interactions of PBP3 with divisome partners were often weak, suggesting that they are mainly mediated by FtsW. While FtsBLQ and FtsN do not interact (or interact weakly) with each other, they directly and independently interact with higher affinity with the synthase subcomplex FtsW-PBP3-PBP1b via FtsW and PBP1b. These results are consistent with the fact that pretargeted FtsQ was not able to recruit FtsN (67), and FRET experiments showed interactions between FtsN and FtsW, FtsN, and PBP3 but lack of interaction between FtsN and FtsQ (31). On the other hand, our activity studies using different combinations of the proteins that compose the septum synthesis core

of the divisome revealed that the GTase activity of PBP1b is repressed by FtsBLQ complex and that the presence of FtsN suppresses this inhibition. Moreover, we found that FtsBLQ is also able to inhibit the PBP3 activity on a thioester substrate and thus exert a double control on sPG synthesis. The inhibition of PBP1b GTase is mediated by FtsBL,

which interacts with PBP1b independently from FtsQ, and that of PBP3 is mediated by FtsQ. The fact that only the FtsL^{D93A} mutant and not FtsB mutants affects the function of FtsBLQ toward PBP1b suggests that FtsL and FtsB play distinct roles as proposed elsewhere (41), that the inhibition is essentially mediated by FtsL, and that residue D93 of the CCD region plays an essential role in the specific regulation of PBP1b and could explain the physiological role of this mutant observed *in vivo* (41). This result is consistent with previous observations that FtsLs from *E. coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus pneumoniae*

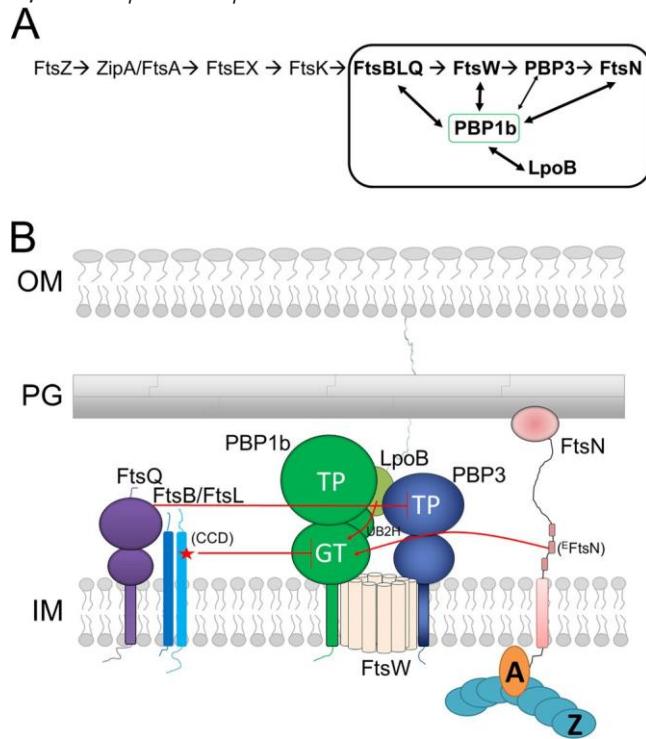


FIG 8 Schematic representation of the linear recruitment pathway of the divisome and a regulation model of the septal synthase subcomplex (FtsW-PBP3-PBP1b) by FtsBLQ, FtsN, and the lipoprotein LpoB.

(A) Linear recruitment pathway of the divisome with the septal peptidoglycan (sPG) synthesis core shown in a frame; protein-protein interactions are shown with arrows. (B) Topology of the synthase subcomplex and the regulatory proteins (FtsBLQ, FtsN, and LpoB) in the cell envelope. FtsBLQ subcomplex inhibits the GTase activity of PBP1b (via FtsL) and the TPase domain of PBP3 (via FtsQ). Interaction of FtsN via the essential region (^EFtsN) and of LpoB with PBP1b suppresses the inhibition by FtsBLQ, activating PBP1b and probably the whole synthase subcomplex. Interaction of FtsN with FtsA and LpoB with the outer membrane allows the coordination of sPG synthesis with cytoplasmic, inner (IM), and outer membrane (OM) events. CCD, constriction control domain of FtsL.

moniae are highly unstable in the absence of their partners FtsB/DivIC or FtsQ/DivIB, and with the high turnover of FtsL involving the membrane protease Yluc in *B. subtilis* that was shown to regulate the level of FtsL and thereby that of the functional subcomplex (35, 68, 69). These results shed light on the molecular function of the FtsBLQ complex in the regulation of sPG synthesis and its link with FtsN, providing for the first time an enzymatic explanation for the observed *in vivo* studies and revealing PBP1b as an FtsBLQ target.

^{CCD}FtsL (the CCD sequence of FtsL, underlined) and surrounding residues (85 to 95, EENALGDHSRVE) are enriched with negatively

charged residues (shown in bold). Interestingly, the $\text{^E}FtsN$ sequence (residues 75 to 93, LPPKPEERWRYIKELESRQ) is reminiscent of that of the $^{CCD}FtsL$ with equivalent negatively charged residues, including two consecutive glutamates, suggesting that these two motifs may compete for the same binding site on PBP1b (Fig. 8). It is worth noting that the distances between the membrane surface and the GTase domain of PBP1b on the one side and the $^{CCD}FtsL$ and $\text{^E}FtsN$ motifs on the other side are similar, which would allow direct interaction between the latter motifs and the GTase domain.

Importantly, in addition to the elucidation of the role of FtsBLQ, our findings help to better define the exact function of FtsN. This protein does not simply activate PBP1b, which has a relatively high basal activity without activation. The fact that FtsN is no longer required when FtsBLQ is not functional indicates that the principal function of FtsN is to relieve the repression by FtsBLQ, probably through competition for PBP1b. The observation that the W83L mutation in the essential periplasmic region of FtsN ($\text{^E}FtsN$) was less efficient in the interaction with and activation of PBP1b provides direct evidence that $\text{^E}FtsN$ modulates the function of PBP1b and that the latter contributes to sPG synthesis and cell constriction. Using a thioester substrate, the activity of PBP3 was inhibited by FtsBLQ and FtsQ, but FtsN had no effect. The double inhibition of the PBP1b GTase activity and the PBP3 TPase activity by FtsBLQ would ensure a double level of control and a perfect repression of the divisome during the maturation stage. The displacement of FtsBLQ and the initiation of sPG synthesis could be allowed only by the recruitment and buildup of FtsN.

Altogether, our results and the available published data suggest that PBP1b, PBP₃, and FtsW form an sPG synthase subcomplex of the divisome regulated by the antagonist activities of FtsBLQ and FtsN (Fig. 8) (in coordination with cytoplasmic events via FtsA) and LpoB (with CpoB and Tol system) coordinating sPG synthesis with outer membrane constriction (13). This organization enables a precise and balanced spatio-temporal polymerase activity of the sPG synthase subcomplex. Premature stimulation of this activity (lack of repression by FtsBLQ) or absence of derepression by FtsN results in malfunctioning of the divisome, a cell morphogenesis defect, and eventual lysis.

Publication 2

The bacterial cell division protein fragment ^EFtsN binds to and activates the major peptidoglycan synthase PBP1b

Adrien Boes¹, Frederic Kerff¹, Raphael Herman¹, Thierry Touze², Eefjan Breukink³,
Mohammed Terrak^{1*}

¹ InBioS-Centre d'Ingénierie des Protéines, Liège University, B6a, Quartier Agora, allée du six Août 11, 4000 Liège 1, Belgium

² Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Gif-sur-Yvette, France.

³ Membrane Biochemistry and Biophysics, Department of Chemistry, Faculty of Science, Utrecht University, The Netherlands.

***Corresponding author :** Mohammed Terrak,

E-mail: mterrak@uliege.be

Running title: Régulation of PBP1b by FtsN

Keywords: Peptidoglycan, divisome, Penicillin Binding-Protein 1b (PBP1b), FtsN, Lipid II

Abstract

Peptidoglycan (PG) is an essential constituent of the bacterial cell wall. During cell division, the machinery responsible for PG synthesis localizes mid-cell, at the septum, under the control of a multiprotein complex called the divisome. In *Escherichia coli*, septal PG synthesis and cell constriction rely on the accumulation of FtsN at the division site. Interestingly, a short sequence of FtsN (L75 to Q93, known as ^EFtsN) was shown to be essential and sufficient for its functioning *in vivo*, but what exactly this sequence is doing remained unknown. Here, we show that ^EFtsN binds specifically to the major PG synthase PBP1b and is sufficient to stimulate its biosynthetic glycosyltransferase (GTase) activity. We also report the crystal structure of PBP1b in complex with ^EFtsN, which demonstrates ^EFtsN binds at the junction between the GTase and UB2H domains of PBP1b. Interestingly, mutations to two residues (R141A/R397A) within the ^EFtsN binding pocket reduced the activation of PBP1b by FtsN but not by the lipoprotein LpoB. This mutant was unable to rescue *ponB-ponA^{ts}* strain, that lack PBP1b and has a thermosensitive PBP1a, at nonpermissive temperature and induced a mild cell chaining phenotype and cell lysis. Altogether, the results show that ^EFtsN interacts with PBP1b and that this interaction plays a role in the activation of its GTase activity by FtsN, which may contribute to the overall septal PG synthesis and regulation during cell division.

Introduction

Peptidoglycan (PG) is an essential constituent of the bacterial cell wall and a major antibacterial target; it surrounds the cytoplasmic membrane, determines the cell shape and protects the cell from rupture under internal osmotic pressure. The PG structure consists of glycan strands made of alternating β -1,4-linked *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) residues cross-linked by peptides (1). It is assembled using the lipid II (undecaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc-(pentapeptide)-GlcNAc), a cell wall precursor, by the GTase activities of the class A penicillin-binding proteins (aPBPs) and SEDS (shape, elongation, division,

and sporulation) proteins; and cross-linked by the transpeptidase (TPase) activities of class A and class B PBPs (bPBPs) (2–4). The GTase and TPase activities are coupled within the same aPBPs and also with their bPBPs TPase partners (e.g., PBP1a-PBP2, PBP1b-PBP3) (5). Similarly, the GTase activities of the SEDS proteins are regulated by a cognate bPBP (RodA-PBP2 and FtsW-PBP3) (3, 6–8). The activities of the PBPs were shown to be regulated within multiprotein complexes allowing a concerted PG synthesis and sacculus enlargement in line with cell cycle progression (9–12).

Bacteria generally have at least one bifunctional (GTase/TPase) PBP of class A and one monofunctional (TPase only) PBP of class B (2, 13). *E. coli* contains three aPBPs: PBP1a, 1b and 1c, and two bPBPs: PBP2 and PBP3, the latter being involved in cell elongation and division, respectively (14). PBP1a and PBP1b are major PG synthases and at least one of them is required for cell viability (15). Although the two PBPs are exchangeable, they likely play specific functions during the cell cycle. PBP1a is mainly involved in cell elongation in partnership with PBP2, while PBP1b exhibits a preference for cell division in agreement with its enrichment at midcell during cell constriction (12, 16–18). PBP1b has a modular structure, composed of an N-terminal tail and a transmembrane anchor followed by the GTase and TPase catalytic domains separated by the regulatory UB2H domain. PBP1b was shown *in vitro* to form a ternary complex with FtsW and PBP3 (8), which constitutes the septal synthase subcomplex of the divisome. This complex interacts with the divisome regulatory proteins FtsBLQ, FtsN and the outer-membrane lipoprotein LpoB (9–11). FtsN is the last essential protein that localizes at the division site; its accumulation through a self-enhanced positive feedback mechanism, triggers cell constriction (19). LpoB binds to the UB2H domain of PBP1b and stimulates both of its catalytic activities (20). FtsN and LpoB bind simultaneously to PBP1b and synergistically stimulate the GTase activity of PBP1b (12). The GTase activity of PBP1b is repressed by FtsBLQ (via FtsL) during divisome assembly and the presence of FtsN and/or LpoB suppresses this inhibition (9). Moreover, FtsBLQ (via FtsQ) was also shown to inhibit the TPase activity of PBP3 but not that of PBP1b (9). On the other hand, CpoB interacts with TolA and both proteins bind to the PBP1b-LpoB complex, between the UB2H and TPase domains, thus inhibiting the TPase activity of PBP1b but not its GTase activity (12). This regulatory system blocks septal PG (sPG) synthesis catalyzed by PBP1b until the maturation of the divisome is signaled by the accumulation of FtsN, which stimulates PBP1b and

counterbalances the inhibitory effect of FtsBLQ, thus contributing to sPG synthesis and cell constriction.

From a structural point of view, FtsN is a bitopic membrane protein composed of a small cytoplasmic domain, a transmembrane α -helix and a large periplasmic domain (21, 22). The cytoplasmic domain of FtsN interacts with the 1C subdomain of the cytoplasmic cell division protein FtsA, which is largely responsible for the recruitment of FtsN to the divisome (23, 24). The periplasmic domain of FtsN is further divided into three subdomains: a membrane-proximal portion containing three potential short α -helices, a glutamine rich central region and a PG binding SPOR (sporulation-related repeat) domain at the C-terminus which binds preferentially to glycan chains devoid of stem peptides (25, 26). The region located around α -helix 2 (L75-Q94, E FtsN) is essential for the function of FtsN (19, 27).

In this work, we have used complementary techniques including fluorescence anisotropy binding assays, activity assays, cross-linking and x-ray crystallography, and obtained clear evidence that E FtsN region is sufficient for direct binding to PBP1b and the stimulation of its GTase activity *in vitro*. Furthermore, we determined the crystal structure of PBP1b in complex with E FtsN peptide and identified the binding site of E FtsN between the GTase and UB2H domains of PBP1b.

Results

E FtsN is sufficient for the stimulation of the GTase activity of PBP1b

The stimulation of PBP1b *in vitro* by FtsN is well established (5, 28). *In vivo*, a small periplasmic domain of FtsN (E FtsN: L75 to Q93) (Fig. 1A) is required and sufficient for function in cell division (27), but the molecular mechanism of PBP1b activation remains largely unknown. The first indication that E FtsN was involved in PBP1b activation originates from the *in vitro* study of the FtsN mutant W83L. This residue change not only impairs FtsN activity *in vivo* (27), but is less able to stimulate PBP1b activity and to suppress FtsBLQ-mediated inhibition of PBP1b GTase activity *in vitro* (9). In addition, the interaction between FtsN^{W83L} mutant and

PBP1b was reduced compared to the wild-type protein. Based on these observations, we prepared the synthetic peptide (E FtsN: L75 to Q93) to test its effect on PBP1b. Interestingly, although a higher concentration than full length FtsN protein was required (50 μ M vs ~1 μ M), presumably because of the lack of the transmembrane segment (see below), the peptide was able to stimulate the GTase activity of PBP1b (Fig. 1B), but has no effect on that of PBP1a (Fig. 1C), confirming that E FtsN directly contributes to PBP1b activation. This result is consistent with *in vivo* data showing that E FtsN (GFP fusion) was functional only when overexpressed (19, 27). When the activity of the TPase domain of PBP1b was analyzed using S2d (amimic of the D-Ala-D-Ala of the natural substrate) as substrate, the addition of FtsN had no effect (Fig. 1D), indicating that the protein only modulates the GTase activity directly but not the TPase activity of PBP1b.

It was previously shown, using different variants of FtsN (28), that multiple interaction sites contribute to the binding with PBP1b (28). The soluble form (sFtsN, Δ 1-57), lacking the cytoplasmic tail and the transmembrane (TM) anchor, displayed significantly reduced stimulatory effect on the PBP1b activity (29). In order to compare the *in vitro* activity of the membrane bound proximal region containing the three potential α -helices with the full-length protein, we have prepared a truncated variant of FtsN (FtsN¹³⁰ encompassing residues M1 to R130) (Fig 1. A, F). This variant was found to bind PBP1b and to stimulate its GTase activity to a lesser extent compared to full length protein, but was much more efficient in PBP1b activation than the E FtsN peptide (Fig. 1 E-F). Altogether, these data indicate that the N-terminal region, including the TM segment, is important for high affinity binding and efficient activation of PBP1b. In addition, the central Gln-rich region and SPOR

domain seem to contribute to the optimal activation of PBP1b.

E^E FtsN interacts specifically with PBP1b but not with PBP3, FtsW-PBP3 or FtsBLQ

In order to measure the binding between E^E FtsN and PBP1b or other divisome proteins, a fluorescent peptide (FITC-K69-Q93), containing a FITC fluorophore attached at the N-terminus of the minimal sequence (L75-Q93) via six additional amino acids of FtsN (to avoid interference with binding), was prepared and used as a probe to develop a fluorescence anisotropy (FA) assay. Interaction studies with PBP1b show high increase of the FA signal and fitting of the graph allowed the determination of a dissociation constant k_d of $8.1 \pm 1.7 \mu\text{M}$ (Fig. 2A). In contrast, no significant change in the FA signal was observed with PBP1a, PBP3, FtsW-PBP3 and FtsBLQ complexes (Fig. 2A-B). This result is consistent with direct and specific interaction of E^E FtsN with PBP1b and suggests that E^E FtsN alone is not sufficient for direct interaction with FtsW-PBP3 or FtsBLQ as previously suggested (27). This result is consistent with the absence of strong interaction between FtsN and FtsBLQ and with the fact that FtsN has no effect on the activity of PBP3 (9).

To further characterize the interaction between E^E FtsN and PBP1b, we performed cross-linking experiments using the FITC-K69-Q93 peptide in order to facilitate the visualization of the adduct. The heterobifunctional cross-linking agent EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide), a zero-length cross-linker that couples carboxyl groups to primary amines, efficiently coupled PBP1b to the fluorescent peptide (Fig. 2C). SDS-PAGE, followed either by Coomassie staining or fluorescence labelling, revealed a band slightly higher (PBP1b + peptide) than PBP1b alone labeled with fluorescent ampicillin. The band intensity increases when the concentration of the cross-linker was increased. This result further confirms that E^E FtsN interacts with PBP1b.

Crystal structure of PBP1b in complex with E^E FtsN

Having strong evidence of the binding of E^E FtsN to PBP1b, we performed co-crystallization assays between PBP1b (58-804), both in the presence and absence of moenomycin A which helps in the crystallization of PBP1b, and purified E^E FtsN (L75-Q93) peptide in order to identify the binding site of this domain on PBP1b. Crystals, which were only obtained in the presence of moenomycin A, belong to the space group $P2_12_12$ (Table 1), similar to those of previously reported for PBP1b structures (30, 31). (30, 31). The diffraction data were anisotropic and therefore additional processing was carried out with Staraniso (32). The three axes of the ellipsoid used to cutoff the resolution were 2.3 Å, 4.3 Å and 2.3 Å. The structure was solved to 2.4 Å resolution by molecular replacement and showed an additional electron-density between the GTase and the UB2H domains (Fig. 3A-D). Because of its initial low quality, attempt to place a helix in both directions and an elongated conformation of the main chain were initially tested. The best solution was selected based on the R_{free} and the improvement of the electron density after refinement. The side chain attribution was done using the secondary structure prediction of E^E FtsN, with P79 and S91 respectively capping the N- and C-terminal ends of the helix. Attempt at shifting the sequence in both directions on the helix did not lead to improved R_{free} or electron density. This 13 amino acid helix mostly interacts with the GTase domain and runs approximately parallel to its last α 12 helix. Three hydrogen bonds are observed with PBP1b, between the side chain of W83 and the main chain carbonyl of Q384 (11 12 loop, GTase domain), between the main chain carbonyl of L89 and side chain hydroxyl of T140 (1 2 loop, UB2H domain), and between the E90 side chain and the R141 side chain (1 2 loop, UB2H) as well as the L344 main chain (9 10 loop, GTase) (Fig. 3C-F). In addition, Y85, I86 and L89 from E^E FtsN form a hydrophobic cluster with L224 (2), L344 (9 10 loop), I386, L390 and L394 (12) from the GTase domain (Fig. 3C-F).

Compared with other PBP1b structures available, no major conformation change was observed upon E^E FtsN binding with a rmsd of 0.85 Å over 685 common carbons (PDB code 5HLA) (Fig. 3B). The differences are however larger in the GTase domain (rmsd 1.0 Å) than in the TPase (rmsd 0.56

\AA) and the UB2H ($\text{rmsd} 0.38 \text{ \AA}$) domains. In the structure of the PBP1b- E FtsN complex, the GTase domain is also characterized by overall poorer electron densities compared to the rest of the protein as well as, compared to the GTase domains of other structures available. Of note, the crystals were only obtained in the presence of moenomycin A, therefore it is possible that this ligand may prevent the conformational change induced by the peptide. Nevertheless, we observed a significant destabilization of the GTase domain. This is materialized by a higher mean B factor for carbons of the GTase domain (125 \AA^2) compared to other PBP1b structures (75 \AA^2 for 5HLA), while the TPase and UB2H domains are characterized by lower and more similar values (50 \AA^2 and 48 \AA^2 respectively, versus 37 \AA^2 and 46 \AA^2 in the 5HLA structure). This could indicate that the conformational change responsible for the increased GTase activity may indeed be hindered by either the binding of moenomycin A required for crystallization, and/or the crystal packing, which strongly traps the GTase domain in an inactive state while the peptide attempts to displace it to an active state.

Mutations in the E FtsN binding pocket reduce activation of PBP1b by FtsN and induce cell elongation and lysis

To confirm the importance of E FtsN binding site in PBP1b activation, and attempt to establish a link between this site and cell division, we addressed the roles of residues T140 and R141 from the UB2H domain side of the binding cavity that interact with E FtsN via their side chains and the residue R397 from the GTase domain side of this cavity, which participate in the same positively charged residues cluster as R141 and could contribute to the interaction with E90 of E FtsN according to other PBP1b structures. All these residues were modified to Ala and single or double mutations were introduced in the *ponB* gene. The activity of the mutants was first evaluated by complementation experiments using *E. coli* EJ801 ($\Delta ponB-ponA^{ts}$) (33) as a host strain (results in 10 g/L LB medium or low salt 0.5 g/L LB were comparable). The single mutants T140A, R141A, R397A and the double mutants T140A/R141A and T140A/R397A were able to restore the growth of the strain at the non-permissive temperature (42°C) (Fig. 4A) and the cells exhibited normal phenotype. In contrast, the double mutant PBP1b^{R141A-R397A} was unable to rescue *E. coli* EJ801 at 42°C (Fig. 4A). This double mutant was stable at 42°C and its GTase and Bocillin binding activities were not affected after 1h incubation at this temperature (Fig. S1). The observation of the cells after 1 hour at the

nonpermissive temperature showed a mild elongated phenotype ($L: 6.14 \pm 1.84 \mu\text{m}$ vs $2.17 \pm 0.46 \mu\text{m}$) before lysis (Fig. 4B-D). Moreover, while the purified PBP1b^{R141A-R397A} mutant showed a minor or no difference in the GTase activity compared to the wild-type protein, its activation by FtsN was reduced by two-fold (Fig. 4E). Interestingly, the activation of PBP1b^{R141A-R397A} by LpoB remained unchanged (Fig. S2). These results indicate that, as a consequence of the mutations in E FtsN binding site, the activation of PBP1b by FtsN was reduced causing defects in sPG integrity and cell division. This strongly confirms the link between PBP1b and FtsN during cell division and demonstrates the role of E FtsN in the activation of its GTase activity.

Discussion

The mechanisms of *E. coli* septal PG synthesis and regulation are complex and involve several trans-envelope factors, with FtsA, FtsBLQ, FtsW, PBP3 and FtsN playing direct and essential roles in these processes (34–36). FtsW and PBP3 are the septum-specific GTase and TPase respectively (37–39). Notably, PBP1b was shown to localize to the division site, to interact with several core divisome proteins and its activity that contribute about 50–70b of sPG synthesis in the absence of the other GTase (PBP1a, PBP1c and MtgA) became essential (8, 9, 12, 18, 28, 37, 40). FtsN, on the one hand, and particularly its essential domain E FtsN (27), plays a major role in the initiation of sPG synthesis that governs cell constriction, but what exactly E FtsN does and its ultimate target remained unclear. On the other hand, biochemical data have shown that FtsN interacts with the major PG synthase PBP1b and stimulates its GTase activity (5, 28). Using different techniques including FA binding assay, activity assay, cross-linking, X-ray crystallography, mutagenesis and complementation, we provide evidence that E FtsN region is sufficient for direct binding to PBP1b and the partial stimulation of its GTase activity. Importantly, the crystal structure of the PBP1b- E FtsN complex allowed the identification of the binding site of E FtsN being located between the GTase and UB2H domains of PBP1b. The GTase domain accounts for most of the interaction with E FtsN, but two residues (T140 and R141), in the 1 2 loop of the UB2H domain pointing towards the GTase domain, are also

42) involved in the binding. This is consistent with the activation of the GTase but not the TPase activity of PBP1b by FtsN. The binding site of ^EFtsN is distinct from that of LpoB, which binds the exposed surface of UB2H domain (20, 41). This is supported by the fact that FtsN and LpoB bind simultaneously to PBP1b and that the stimulation of the GTase activity of PBP1b by FtsN was synergistic with the stimulation by LpoB (5). Furthermore, the structure reveals that the conserved residues W83, Y85 and L89 of ^EFtsN, which were shown to be important for the *in vivo* function of the protein (27), together with I86 and E90 are directly involved in the interaction with PBP1b. Interestingly, the mutant FtsN^{W83L} was shown to exhibit reduced binding and activation of PBP1b (9). The double mutation R141A/R397A in the ^EFtsN binding pocket of PBP1b reduces the activation of PBP1b by FtsN but not by LpoB. In addition, this mutant was unable to rescue *ponB-ponA^{ts}* strain at nonpermissive temperature and induced a mild cell chaining phenotype and cell lysis indicating sPG synthesis and division defects. These data suggest that the observed chaining phenotype is the result of the partial suppression of the ^EFtsN binding site. Altogether, the present results reveal that PBP1b, the major class A PBP, is one of the binding targets of ^EFtsN, and that ^EFtsN is an important determinant for the stimulation of the GTase activity of PBP1b by FtsN. This could contribute to sPG synthesis regulation during cell division. However, our assays could not detect direct interaction between ^EFtsN and FtsW-PBP3 or FtsBLQ, as previously proposed (27), but this does not exclude that such an interaction occurs with one of these proteins when ^EFtsN is displayed in the context of the full length FtsN or an alternative membrane bound variant. Overall, our results bridge the gap between the existing biochemical and *in vivo* data (9, 19, 27, 28, 42) and provide additional information to the general model of regulation of cell division in *E. coli*. FtsN seems to play multiple and intricate roles (regulation of sPG synthesis and late hydrolysis) (19, 42) that are coordinated with events on both sides of the cytoplasmic membrane, starting early in the cell cycle via its interaction with FtsA in the

cytoplasm (22, 43–46) and the gradual accumulation throughout the cell cycle (47), using a self-enhanced positive feedback mechanism (19). During divisome assembly, the GTase activity of PBP1b (as well as the TPase activity of PBP3) is kept inactive by the FtsBLQ complex until FtsN reaches a critical threshold which enables it to relieve this inhibition, probably by disrupting the interaction with FtsBLQ, and to restore PBP1b activity (via direct interaction with ^EFtsN) (9). This contributes to the global sPG synthesis, probably in coordination with FtsW-PBP3 complex (3, 8, 37). sPG synthesis then recruits the amidases, that hydrolyze sPG and trigger cell constriction (42), this creates a high affinity binding substrate (denuded PG) of the SPOR domain allowing the recruitment of more FtsN and accelerates the constriction process (25, 26). In *E. coli*, cell wall constriction depends mainly on sPG synthesis and not on FtsZ treadmilling (40, 48). PBP1b was shown to play important role in sPG synthesis complementary to that of FtsW and PBP3 (37, 40) and to exhibit two populations, a fast- and a slow-moving fractions (49). The slow-moving fraction represents the enzymes catalytically active in PG synthesis. FtsN also exhibits a dynamic behavior and its localization was shown to be spatially separated from constricting FtsZ-ring (50). As FtsN, a specific divisome protein, binds and activates PBP1b, it may play a role in the transition of PBP1b from the fast and low-activity state to the slow-moving processive enzyme at the division site.

Table 1. X-ray crystallographic data collection and refinement statistics of *E. coli* PBP1b in complex with ^EFtsN

PBP1b-^EFtsN	
Data Collection :	
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2
a, b, c (Å)	63.1, 283.0, 62.7
α, β, γ (°)	90, 90, 90
Resolution range (Å) ^a	47.2 – 2.4 (2.51 – 2.4)
<I>/<σI> ^a	8.1 (1.5)
Completeness elliptical (%) ^a	95.5 (85.9)
Completeness spherical (%) ^a	57.1 (22.3)
Redundancy ^a	8.5 (7.2)
Refinement:	
Resolution range (Å)	47.2 – 2.4
No. of unique reflections	25830
R work (%)	22.5
R free (%)	25.6
No. atoms	
Protein	5525
Ligands	77
Water	55
RMS deviations from ideal stereochemistry	
Bond lengths (Å)	0.01
Bond angles (°)	1.5
Mean B factor (Å ²)	
Protein	78.2
Ligands	150
Water	36.1
Ramachandran plot:	
Favoured region (%)	94.2
Allowed regions (%)	5.4
Outlier regions (%)	0.4

Figure

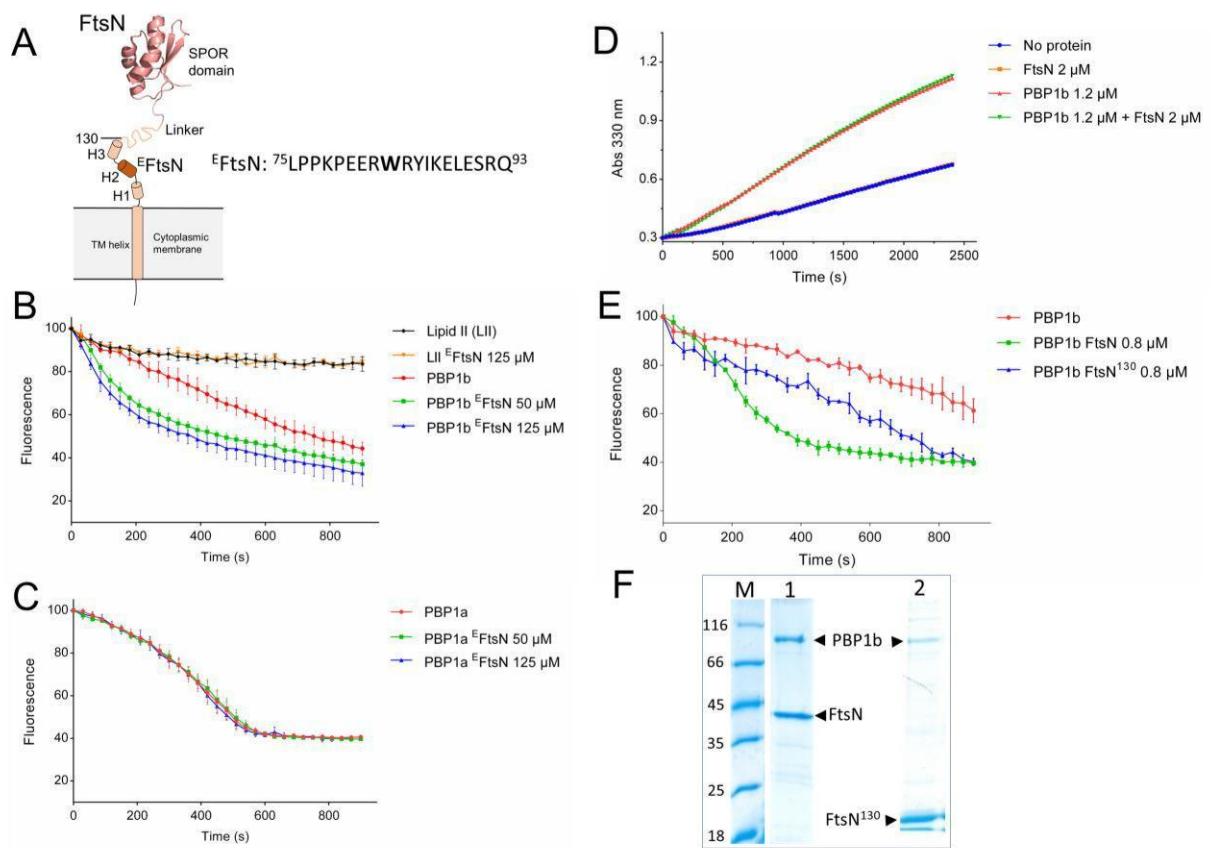


Figure 1. Activation of PBP1b GTase by ^EFtsN and FtsN¹³⁰. (A) Schematic representation of FtsN, the protein is composed of a short cytoplasmic tail (1-33) and a transmembrane (TM 34-53) helix followed by

3 potential short helices (H1 62-67, H2 80-93 and H3 117-123), an unstructured Q-rich linker (129-225) and a C-terminal SPOR domain (243-319) (NMR structure 1UTA, (64)). The essential region of FtsN (^EFtsN) correspond to the sequence L75-Q93 around H2. The construct FtsN¹³⁰ (M1-R130) ends just after H3. The numbers indicate the amino acid positions of FtsN. (B, C and E) the GTase activity of PBP1b and PBP1a was monitored by continuous fluorescence assay using dansyl-lipid II (LII) as substrate. The error bars represent the values as mean ± s.d. of three experiments. ^EFtsN specifically stimulates the GTase activity of PBP1b (B) but has no effect on PBP1a (C). (D) The activity of the TPase domain of PBP1b was monitored by following the hydrolysis of S2d in the presence and absence of FtsN (a representative of 3 independent experiments). FtsN has no effect on the S2d hydrolysis by PBP1b (Abs 330 nm, absorbance at 330 nm). (E) Comparison of the stimulation of the GTase activity of PBP1b (1b) by FtsN and the truncated form FtsN¹³⁰. (F) SDS-PAGE analysis of co-expression and co-purification of HisFtsN-PBP1b (line 1) and HisFtsN¹³⁰-PBP1b (line 2). M, molecular mass marker.

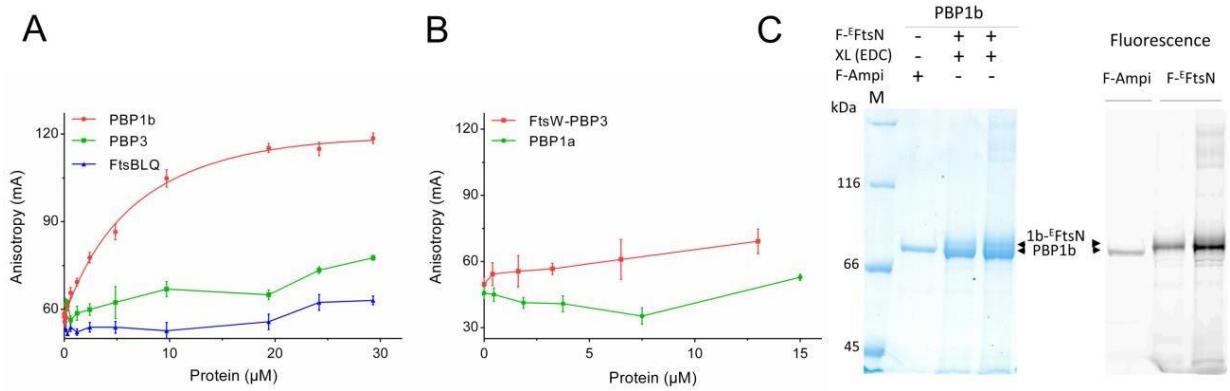


Figure 2. Binding assays between E^E FtsN and PBP1b. (A) Direct binding of fluorescent E^E FtsN (F- E^E FtsN) peptide to PBP1b using fluorescence anisotropy (FA) assay. FA (in mA units) is plotted as a function of protein concentrations. No significant binding is observed between the probe and PBP3, FtsBLQ complex, FtsW-PBP3 complex or PBP1a (A and B). The error bars represent the values as mean \pm s.d. of three experiments. (C) SDS-PAGE analysis of cross-linking (XL) adducts between PBP1b (1b) and F- E^E FtsN peptide (indicated by the upper arrows) using protein:cross-linker molar ratio of 1:1000 (line 2) and 1:2000 (line 3). Left, SDS-PAGE stained with Coomassie blue; right, fluorescence imaging. F-Ampi depicts PBP1b labelled with fluorescent ampicillin. M, molecular mass marker.

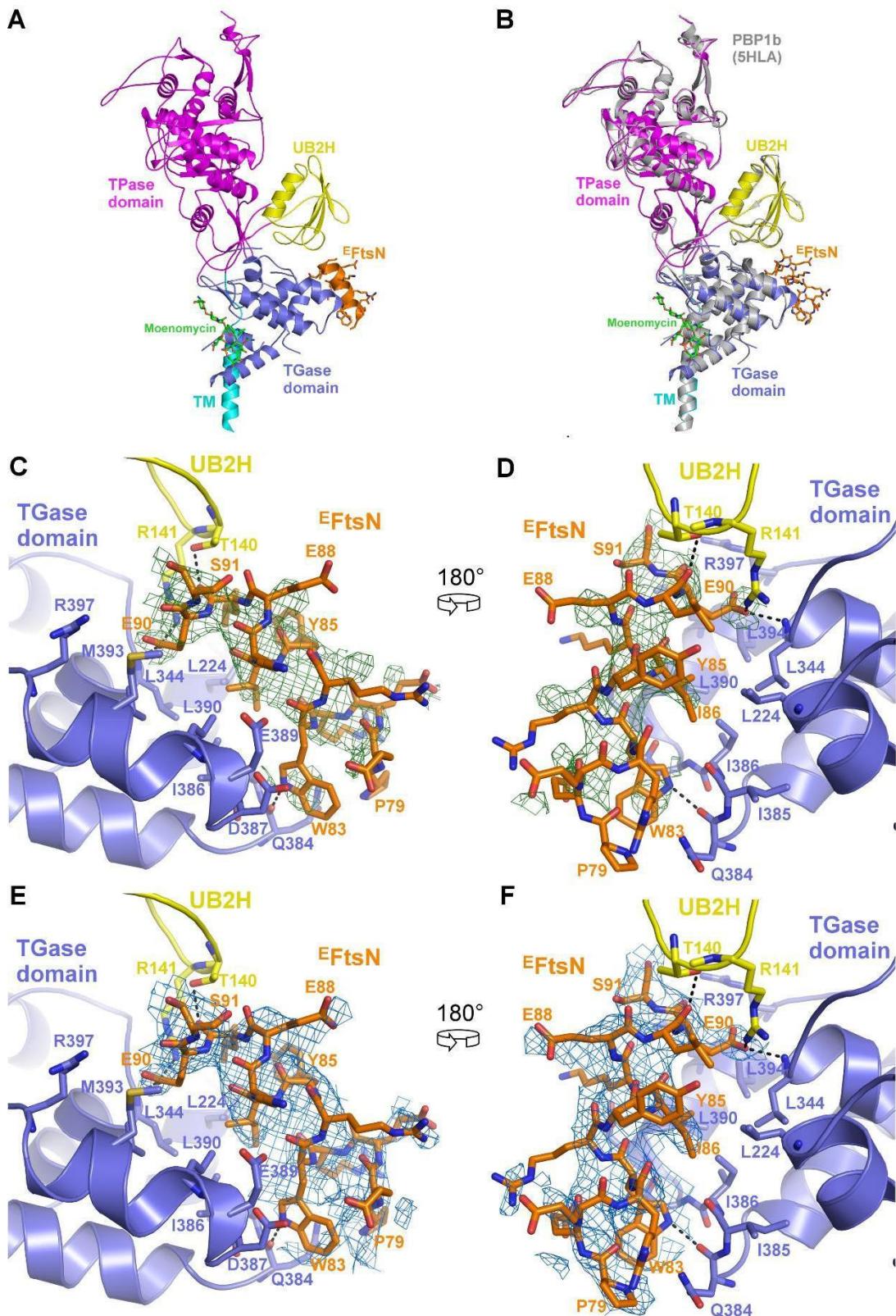


Figure 3. Crystal structure of PBP1b in complex with E FtsN peptide. (A) Cartoon representation of the PBP1b- E FtsN. The TM, UB2H, GTase, and TPase domains are shown with color code in cyan, yellow, blue, and magenta, respectively. The E FtsN peptide is shown in orange. This structure was obtained in the presence of moenomycin A shown in green sticks. (B) Superimposition of the obtained structure (same color code as in a) with that of published PBP1b structure (PDB code 5HLA) in grey. (C-D) Details of the interactions between E FtsN represented as orange sticks and the GTase (blue) and UB2H (yellow) domains of PBP1b presented in two orientations at 180° of each other. H-bonds are displayed as black dashed lines. The Fo-Fc electron-density map obtained before modeling of the peptide is shown around E FtsN at a 2 level in green. (E-F) Same as (C-D) with the 2Fo-Fc electron density map obtained at the end of the refinement.

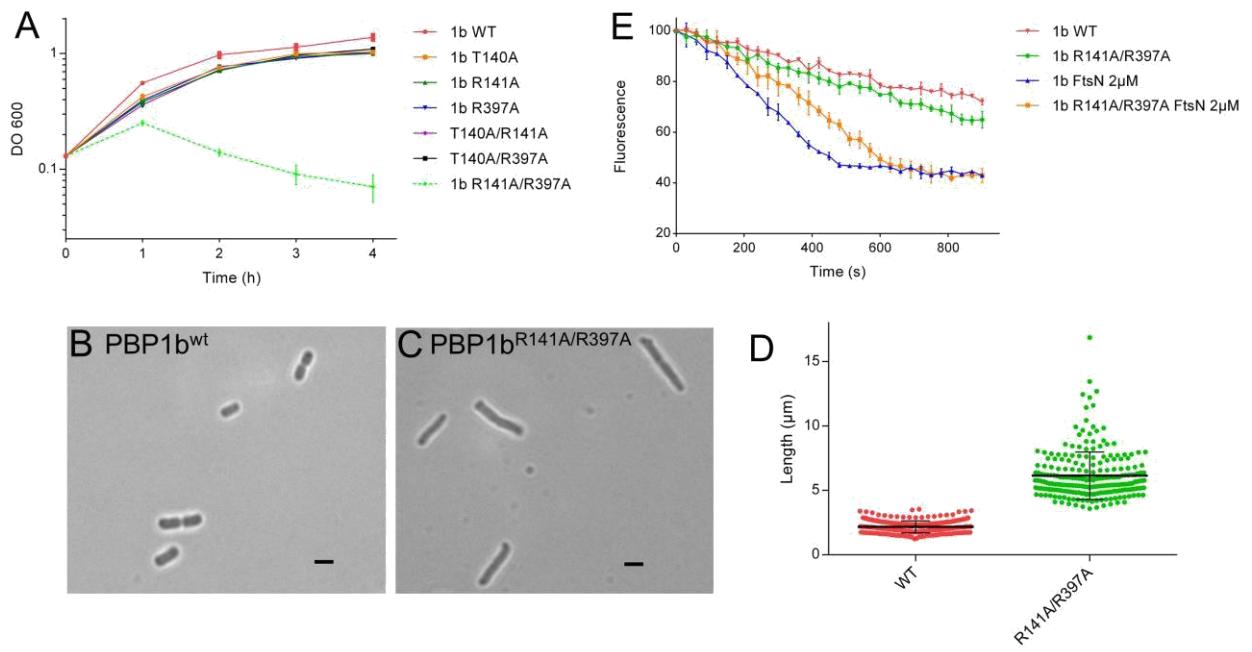


Figure 4. *In vitro* and *in vivo* activities of the PBP1b mutants. (A) complementation assays of *E. coli* EJ801 strain ($\Delta\text{ponB-ponA}^{ts}$) with the plasmids carrying *ponB* (1b^{WT}) gene or *ponB* mutants at non-permissive temperature (42°C). (B and C) microscopy analysis of the EJ801 cells expressing PBP1b^{WT} (B) or PBP1b^{R141A/R397A} (C) after 1h at 42°C. (D) Cell length statistics evaluation of EJ801 expressing PBP1b^{WT} ($n = 250$) or PBP1b^{R141A/R397A} ($n = 250$). (E) Comparison of the GTase activation of PBP1b^{WT} (1b^{WT}) and PBP1b^{R141A/R397A} by FtsN using continuous fluorescence assay. The error bars represent the values as mean \pm s.d. of three experiments.

Publication 3

fluorescence anisotropy assays for high throughput screening of compounds binding to lipid ii, PBP_{1b}, FtsW and MurJ

Adrien Boes¹, Samir olatunji^{1,3}, tamimount Mohammadi², Eefjan Breukink² & Mohammed terrak^{1*}

¹InBioS-Centre d'Ingénierie des Protéines, Liège University, B6a, Quartier Agora, allée du six Août 11, 4000, Liège 1, Belgium.

²Membrane Biochemistry and Biophysics, Department of Chemistry, Faculty of Science, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands. ³Present address: School of Medicine and School of Biochemistry and Immunology, Trinity College Dublin, D02 R590, Dublin, Ireland. *email: terrak@uliege.be

Lipid II precursor and its processing by a flippase and peptidoglycan polymerases are considered key hot spot targets for antibiotics. We have developed a fluorescent anisotropy (FA) assay using a unique and versatile probe (fluorescent lipid II) and monitored direct binding between lipid II and interacting proteins (PBP_{1b}, FtsW and MurJ), as well as between lipid II and interacting antibiotics (vancomycin, nisin, ramoplanin and a small molecule). Competition experiments performed using unlabelled lipid II, four lipid ii-binding antibiotics and moenomycin demonstrate that the assay can detect compounds interacting with lipid II or the proteins. These results provide a proof-of-concept for the use of this assay in a high-throughput screening of compounds against all these targets. In addition, the assay constitutes a powerful tool in the study of the mode of action of compounds that interfere with these processes. Interestingly, FA assay with lipid II probe has the advantage over moenomycin based probe to potentially identify compounds that interfere with both donor and acceptor sites of the aPBPs GTase as well as compounds that bind to lipid II. In addition, this assay would allow the screening of compounds against SEDS proteins and MurJ which do not interact with moenomycin.

Most bacteria surround their cytoplasmic membrane with a peptidoglycan (PG) sacculus that protects the cell from bursting due to the turgor and maintains cell shape¹. In order to propagate, bacteria have to enlarge and divide their cell envelope including their PG sacculus, a net-like polymer consisting of glycan strands made of alternating β-1,4-linked *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) residues cross-linked by peptides¹. The substrate for PG synthesis is the lipid II precursor (undécaprényl-pyrophosphoryl-MurNAc (pentapeptide)-(beta-1,4)-GlcNAc), that is synthesized on the inner face of the cytoplasmic membrane and subsequently translocated through the membrane by a flippase (MurJ/FtsW)²⁻⁴. MurJ is a member of the multidrug/ oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily⁵. RodA and FtsW of the SEDS (shape, elongation, division, and sporulation) family were found to have glycosyltransferase activity whose function in case of FtsW depends on a cognate class B penicillin-binding proteins (bPBP)^{6,7}. When on the periplasmic side of the membrane, lipid II is polymerized by the GTase activities of the class A PBPs (aPBPs) and SEDS proteins (Fig. 1). The resulting glycan chains are cross-linked by the transpeptidase (TPase) activities of aPBPs and bPBPs⁶⁻⁹ (Fig. 1). The functions of these proteins are coordinated with those of interacting proteins in the elongasome and divisome complexes to ensure optimal growth and division of the bacterial cell¹⁰⁻¹³.

Because of their essential role in PG synthesis, the lipid II substrate, its transport across the cytoplasmic membrane (MurJ/FtsW) and its polymerization into PG (PBPs and SEDS) are key target candidates for new antibacterial discoveries. It is not surprising that in their warfare against bacteria, microorganisms (including bacteria) have developed an array of molecules and strategies that inhibit cell wall PG assembly at different stages^{14,15}. The most well-known antibiotics are beta-lactams that covalently bind to the PBPs/TPase active sites and block peptide cross-linking leading to cell lysis. A second strategy is the inhibition of glycan chains polymerization catalysed by the glycosyltransferases of family 51 (GT51 domains of aPBPs and monofunctional GTases)⁹. The

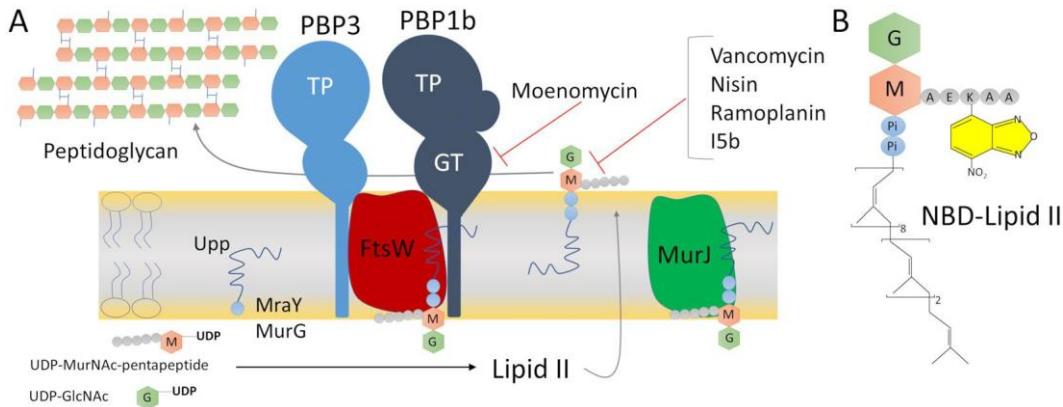


Figure 1. Schematic representation of the late stages of peptidoglycan synthesis. **(A)** The lipid II precursor is assembled at the inner face of cytoplasmic membrane by MraY and MurG from soluble precursors (UDP-MurNAc-pentapeptide and UDP-GlcNAc) and the undécaprényl-phosphate (Upp) lipid carrier. Lipid II is then transported to the outer face of the membrane by MurJ/FtsW where it is polymerized by FtsW and PBPs. The mode of action of the antibiotics are indicated with red lines. **(B)** Structure of the fluorescent NBD-labeled lipid II. Upp is attached to the disaccharide MurNAc-GlucNAc via a pyrophosphate (Pi-Pi). AEKAA depicts the pentapeptide sequence L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala with the NBD fluorophore bound to the Lysin residue.

enzymatic cavity of these proteins can be divided into two substrate binding sites: a donor site for the lipid-bound growing glycan chain, that is also the moenomycin A binding site, and an acceptor site for lipid II. Moenomycin A, is the only known natural product that specifically binds to the GT51 active sites and competitively inhibits PG synthesis¹⁶. It is a potent antibiotic that is not used in human therapy but was used in animal feedstock for decades without reported resistance¹⁷. Bacteriophages also target PG for progeny release, a small *Escherichia coli* bacteriophage levivirus M was found to encode a protein antibiotic (Lys^M) that specifically inhibits the activity of MurJ and induces lysis of the host¹⁵. Many other cell wall inhibitors such as the natural products vancomycin, ramoplanin, teixobactin and nisin, bind directly to the lipid II precursor by different mechanisms and prevent its access and further processing by proteins interacting with lipid II^{14,18,19}.

The fight against antimicrobial resistance requires the exploration of new bacterial targets to identify novel antibiotic classes. In this regard, the peptidoglycan biosynthesis pathway, a proven excellent target of the most prescribed drugs (β -lactam antibiotics) used in the treatment of bacterial infections, is still not fully explored as new essential components and molecular mechanisms are being discovered (MurJ and SEDS proteins).

In this work, we have developed a fluorescent anisotropy assay (also known as fluorescence polarization assay) using a unique and versatile probe (nitrobenzoxadiazole (NBD)-labelled lipid II) to monitor binding between lipid II and interacting proteins (PBP1b, MurJ and FtsW), as well as between lipid II and interacting antibiotics (vancomycin, nisin, ramoplanin and a small molecule). Competition experiments are also shown as proof-of-concept for the use of this assay in a high throughput screening of compounds against all these targets. In addition, the method also represents a powerful tool for the study of the mode of action of compounds that interfere with these processes.

Results

Interaction of NBD-lipid II with PBP1b, FtsW and MurJ using FA assay. To develop a fluorescence anisotropy (FA) assay for interaction studies between lipid II and lipid II-binding proteins or antibiotics, we attached the NBD fluorophore to the lysin residue of the peptide moiety to generate the fluorescent probe NBD-lipid II (Fig. 1B). Three known lipid II-interacting proteins from *E. coli* (Fig. 1A), PBP1b, FtsW (and the complex FtsW-PBP3) and MurJ, have been purified to study their interaction with NBD-lipid II using a FA assay (Fig. S1). Before the binding studies, the optimal conditions for each protein and concentration of the probe were determined. We have also verified that PG polymerization by PBP1b was insignificant in the absence of divalent cations (FA assay condition) (Fig. S2). The concentration of the probe was set at 0.33 μ M and incubated with increasing concentrations of each protein. The results show an increase of the FA signal as a function of protein concentrations until saturation, the signal dynamic range mA was \sim 100 (Fig. 2A). The three proteins and the complex bind NBD-lipid II with high affinity and the determined K_d values were between 0.3 and 1.1 μ M (Table S1). FtsN used as control had no effect on the FA of the probe (Fig. S3). Interestingly, the binding of fluorescent NBD-lipid II to PBP1b, MurJ, FtsW and FtsW-PBP3 could be displaced by increasing concentrations of unlabelled lipid II (Fig. 3A, Table S1), which has no direct effect on the FA of the probe (Fig. S4). These results provide a proof-of-concept that the assays could be used for screening of compounds interfering with the probe (substrate) binding to the target proteins. It is worth noting that the K_d value of the probe for PBP1b ($0.5 \pm 0.2 \mu$ M) is in the same micromolar range as

the K_m value ($\sim 2 \mu\text{M}$). The K_d values of the probe for FtsW and FtsW-PBP3 are similar ($0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$), indicating that PBP3 does not significantly contribute to lipid II binding. The K_d value for FtsW is ~ 4 time lower compared to that of MurJ ($1.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$), indicating that in these conditions FtsW has a higher affinity for lipid II than MurJ. These results are consistent with our previous finding¹³ but, are different from those observed by native mass spectrometry, a K_d value of $2.9 \mu\text{M}$ was determined for lipid II binding to MurJ and the K_d value for FtsW was higher and could not be determined by this technique²⁰.

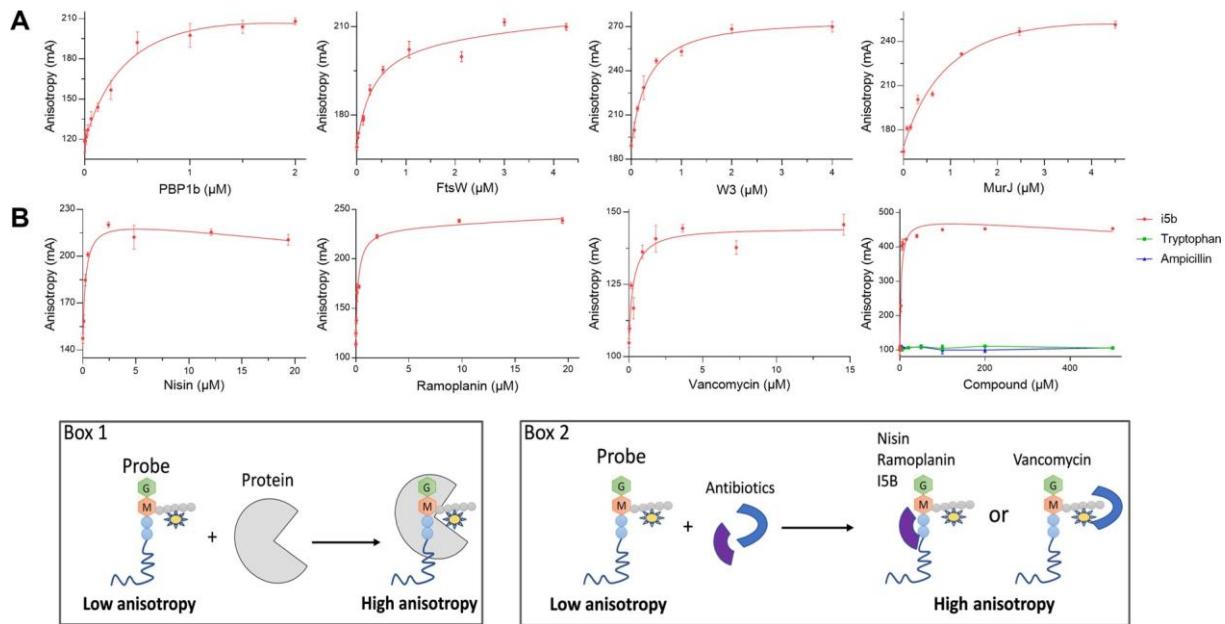


Figure 2. Fluorescence anisotropy assay using the NBD-lipid II as a probe for binding studies with proteins and antibiotics. FA (in mA units) is plotted as a function of protein or antibiotic concentrations. The error bars represent the FA values as mean \pm s.d. of triplicate experiments using the same buffer and protein conditions.
(A) Direct binding of NBD-lipid II probe ($0.33 \mu\text{M}$) to PBP1b, FtsW, FtsW-PBP3 complex and MurJ. **(B)** Direct binding of NBD-lipid II probe ($0.33 \mu\text{M}$) to different antibiotics (nisin, ramoplanin, vancomycin, and the small molecule I5b). The last panel also shows that tryptophan and ampicillin used as controls do not bind to the probe. Box 1 and Box 2 schematically illustrate the corresponding FA assay and the observed FA variations.

Interaction of NBD-lipid II with antibiotics using FA assay. Four antibiotics known to interact with lipid II, vancomycin, nisin, ramoplanin and a small molecule (I5b) have been selected to study their direct interactions with NBD-lipid II using the FA assay. The incubation of the probe with increasing concentrations of the lantibiotic nisin (MM 3354 Da), the glycopeptide vancomycin (MM 1449 Da) and the glycolipopeptide ramoplanin (MM 2254 Da) induced an increase of FA (Fig. 2B). In contrast, moenomycin A (MM 1582 Da), and unlabeled lipid II (MM 1876 Da), used as non-binder controls and with molecular masses similar to those of vancomycin and ramoplanin, did not significantly affect the FA signal of the NBD-lipid II probe (Fig. S4). We have previously discovered a small molecule called I5b that inhibits peptidoglycan polymerization through binding to a phosphate group of lipid II²¹. Interestingly, here we show that it is possible to monitor I5b-binding to NBD-lipid II using the FA assay (Fig. 2B). Ampicillin or tryptophan (indole group is present in the I5b compound) used as a small molecule controls have no significant effect on the FA of the probe (Fig. 2B). These results show that our FA assay can accurately detect interactions between various classes of antibiotics that interact with lipid II by different mechanisms.

Competition of antibiotics with NBD-lipid II:proteins using FA assay. For the competition assays, we choose the lipid II-binding antibiotics used above (nisin, vancomycin, ramoplanin and the small molecule I5b). As a model of protein-binding antibiotic, we used moenomycin which binds to the donor site of the GTase domain of aPBP_s and MGTs and inhibits their polymerase activity. The proteins, PBP1b, MurJ, FtsW and FtsW-PBP3 complexes and NBD-lipid II were mixed with increasing concentrations of the antibiotics. Nisin and ramoplanin both bind to the pyrophosphate moiety of lipid II. They induced FA signal decreases with all proteins, indicating that both antibiotics were able to prevent the formation of the respective NBD-lipid II:protein complexes by sequestering lipid II (Figs. 3B and S5). This is consistent with the published result obtained by native mass spectrometry for lipid II:MurJ with ramoplanin²⁰. In contrast, the addition of vancomycin to PBP1b or FtsW and NBD-lipid II mixture induced an increase of the FA signal in both cases (Fig. 3C). These results indicate that vancomycin binding to the D-Ala-D-Ala moiety does not prevent NBD-lipid II binding to PBP1b and FtsW (conversely probe binding to PBP1b or FtsW does not prevent vancomycin binding) but only prevents its processing by these enzymes. Thus, the ternary complexes, NBD-lipid II:PBP1b:vancomycin and NBD-lipid II:FtsW:vancomycin could be formed, this has been observed previously for FtsW³. These results demonstrate that our FA assay is able to discriminate between the modes of action of nisin and ramoplanin and that of vancomycin. Notably, when FtsW-PBP3 complexed with the probe was used instead of FtsW alone, vancomycin induced a decrease in the FA signal, showing that vancomycin was able to compete with FtsW-PBP3 for lipid II binding (Fig. 3B). This result probably reflects the accessibility of the D-Ala-D-Ala motif in a way that vancomycin was able to displace lipid II from FtsW-PBP3 (without necessarily changing the affinity for lipid II). This is consistent with the previous observation showing that PBP3 binding to FtsW facilitates the accessibility of lipid II by PBP1b¹³, presumably through conformational changes of FtsW induced by PBP3. This is also consistent with the stimulation of the GTase activity of FtsW by a cognate bPBP observed with several SEDS-bPBP pairs⁷. As a consequence, to take advantage of this property, the screening of compounds could be performed with the FtsW-PBP3 complex (or other SEDS-bPBP complexes), that showed similar behaviors in the FA assay with all the compounds tested, instead of FtsW alone. Titration of MurJ and the probe by vancomycin does not induce a significant change of the FA (Fig. 3C), suggesting that the peptide moiety was not accessible to vancomycin in our conditions, while a ternary complex MurJ:lipid II:vancomycin was previously reported using native mass spectrometry²⁰.

Moenomycin binds to the donor site of the GTase domain of PBP1b and has no effect on the FA of the probe (Fig. S4). Thus, we expected that binding of moenomycin to the donor site will displace the probe from this site and induce a decrease of the FA. Surprisingly, the FA increased with increasing moenomycin concentrations (Fig. 3D). Similarly, comparison of the binding of NBD-lipid II to the PBP1b or PBP1b-complexed with moenomycin (protein:momenomycin molar ratio 1:2) shows a higher FA signal

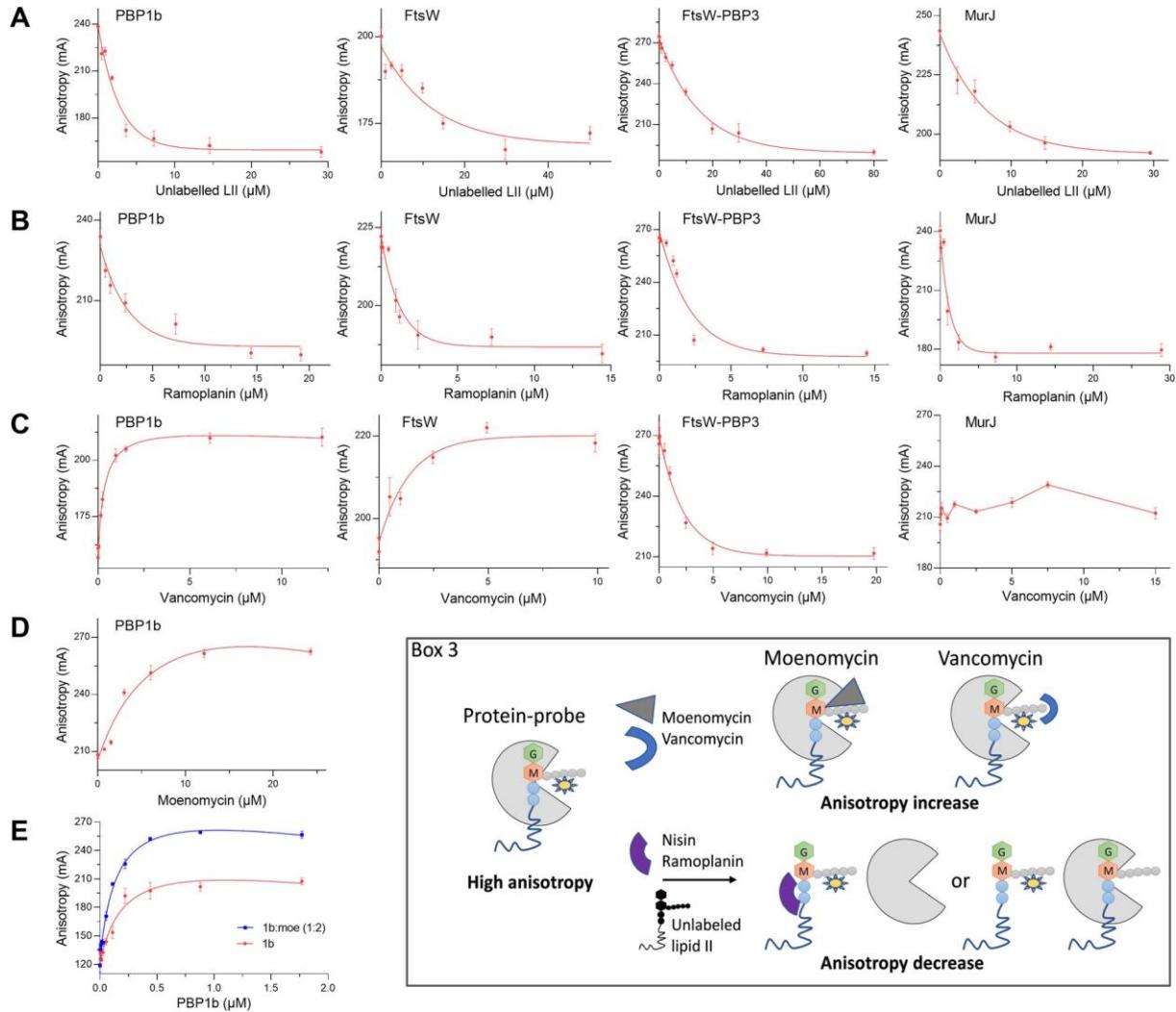


Figure 3. Competition assays of unlabelled lipid II and antibiotics for the proteins (PBP1b, FtsW, FtsW-PBP3 and MurJ)/NBD-lipid II binding show FA modifications (increase or decrease) of the probe. FA (in mA units) is plotted as a function of compound concentrations. The error bars represent the FA values as mean \pm s.d. of triplicate experiments using the same buffer and protein conditions. (A,B) Competitive displacement of the NBD-lipid II probe from binding proteins by unlabelled lipid II and ramoplanin. (C) The increase of FA with vancomycin indicates the formation of a ternary complex with PBP1b:probe and FtsW:probe; the decrease of FA in the presence of vancomycin indicate competitive displacement of the probe from FtsW-PBP3; the addition of vancomycin to MurJ:probe does not induce significant modification of the FA. (D) Binding of the probe to PBP1b in the presence of increasing moenomycin concentrations, moenomycin induces an increase of FA indicating the formation of a ternary complex with PBP1b:probe. (E) Moenomycin binding to PBP1b (PBP1b:moenomycin, 1:2 molar ratio) induces and increase the FA compared to PBP1b alone. Box 3 schematically illustrates the corresponding FA assays and the observed FA variations.

for PBP1b:moenomycin when compared to PBP1b alone (Fig. 3E). This result can be explained on the basis of our previous finding showing a positive cooperativity between the donor and acceptor sites of the GTase domain²². Indeed, using surface plasmon resonance we showed that the binding of lipid II or analogs to the acceptor site of *Staphylococcus aureus* MtgA facilitates the binding of moenomycin to the donor site by allosteric effect. Thus, the results indicate that moenomycin binding to the donor site also increases the affinity of lipid II to the acceptor site of PBP1b GTase domain and confirm the cooperativity mechanism between the donor and acceptor sites of these enzymes. These experiments reveal the versatility of the FA technique: in addition to its ability to identify compounds binding to the active site of PBP1b and potentially to other GT51 enzymes, it also allows the study of their complex mechanism.

Discussions

The final stages of peptidoglycan assembly include the translocation of the lipid II precursor by MurJ/FtsW from the inner to the outer side of the cytoplasmic membrane and its polymerization by the PBPs and SEDS transglycosylases. These processes are essential for peptidoglycan sacculus growth and division and constitute important hot spot targets for known and new antibiotics that can interfere with them. In addition, the lipid II precursor itself is a target of many antibiotics such as vancomycin, ramoplanin or teixobactin. Therefore, an assay based on lipid II as a probe, has the advantage to identify new antibiotics that bind to lipid II or to the proteins allowing its translocation or polymerization into peptidoglycan.

Biochemical production of unlabelled and labelled lipid II, although still a tedious process, becomes feasible in high yield, mainly thanks to the accessibility of high amounts of the limiting undécaprényl phosphate moiety, which can be isolated from plant leaves²³. This prompted us to develop a FA assay, based on NBD-lipid II as a probe for use in the identification of compounds that interact with lipid II or interfere with its enzymatic processing. We have estimated that 0.9 µmole of labelled-lipid II could allow the screening of 100,000 compounds using our standard FA assay. Based on our preliminary data, further optimization and miniaturization could reduce the required amount of the probe by a third.

The FA assay described here allows on the one hand, estimation of direct binding of fluorescent-lipid II to interacting proteins (PBP1b, FtsW and MurJ) and on the other hand, the accurate detection of various classes of antibiotics that bind lipid II by different mechanisms. Interestingly, direct interaction of lipid II with both FtsW and MurJ could be detected, using the same technique for the first time, which is consistent with their proposed biochemical function (whatever their exact function, they must interact with lipid II) while other techniques can detect lipid II interaction with only one protein^{13,20}. This shows that the FA assay is highly sensitive and preserves the stability of the proteins.

Competition experiments performed using unlabelled lipid II, four lipid II-binding antibiotics (vancomycin, nisin, ramoplanin and I5b) and moenomycin demonstrate that the assay can detect compounds interacting with the probe or the proteins even without completely dissociating the complex. The latter case results in an increase of the FA as observed in the experiments with vancomycin and moenomycin. This shows that an inhibitory compound could either increase or decrease the FA signal and therefore compounds that induce significant FA variation in the competition assay should be considered as potential hits and further tested for lipid II probe binding without protein and activity-based assays. In addition to the ability of the FA assay to identify new inhibitors of the PG assembly, it could also constitute a valuable tool in inferring the mechanism of action and mode of binding of new compounds by comparisons with known inhibitors. As the lipid II probe is also the substrate of the flippase and the PG polymerases, the FA assay would also allow the study of the molecular mechanisms of these enzymes and their complexes as observed here with the effect of PBP3 on FtsW and that of moenomycin on PBP1b.

All together the results show that a FA assay based on fluorescent lipid II would allow the identification of new lipid II-interacting antibiotics among both natural products and small molecules libraries as well as compounds binding to the target proteins. FA is a widely used technique in drug research and easily transposable to high-throughput format. Importantly, our FA assay has the advantage, over a previous FA assay based on fluorescent moenomycin, to potentially identify compounds that interfere with both donor and acceptor sites of the aPBPs GTase as well as compounds that bind to lipid II. In addition, this assay would allow the screening of compounds against the SEDS proteins (or SEDS-bPBPs) and MurJ which do not interact with moenomycin.

Publication 4

Article

Squalamine and Aminosterol Mimics Inhibit the Peptidoglycan Glycosyltransferase Activity of PBP1b

Adrien Boes ¹, Jean Michel Brunel ², Adeline Derouaux ¹, Frédéric Kerff ¹, Ahmed Bouhss ^{3,4}, Thierry Touze ³, Eefjan Breukink ⁵ and Mohammed Terrak ^{1,*}

¹ InBioS-Centre d'Ingénierie des Protéines, Liège University, 4000 Liège, Belgium; adrien.boes@doct.uliege.be (A.B.); a.derouaux@xpress-biologics.com (A.D.); fkerff@uliege.be (F.K.)

² UMR_MD1, U-1261, Aix Marseille Univ, INSERM, SSA, MCT, 13385 Marseille, France; bruneljm@yahoo.fr

³ Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette, France; ahmed.bouhss@univ-evry.fr (A.B.); thierry.touze@u-psud.fr (T.T.)

⁴ Laboratoire Structure-Activité des Biomolécules Normales et Pathologiques (SABNP), Univ Evry, INSERM U1204, Université Paris-Saclay, 91025 Evry, France

⁵ Membrane Biochemistry and Biophysics, Department of Chemistry, Faculty of Science, Utrecht University, 3584 CH Utrecht, The Netherlands; E.J.Breukink@uu.nl

* Correspondence: mterrak@uliege.be; Tel.: +33-4366-3332

Received: 2 June 2020; Accepted: 30 June 2020; Published: 2 July 2020

Abstract: Peptidoglycan (PG) is an essential polymer of the bacterial cell wall and a major antibacterial target. Its synthesis requires glycosyltransferase (GTase) and transpeptidase enzymes that, respectively, catalyze glycan chain elongation and their cross-linking to form the protective sacculus of the bacterial cell. The GTase domain of bifunctional penicillin-binding proteins (PBPs) of class A, such as *Escherichia coli* PBP1b, belong to the GTase 51 family. These enzymes play an essential role in PG synthesis, and their specific inhibition by moenomycin was shown to lead to bacterial cell death. In this work, we report that the aminosterol squalamine and mimic compounds present an unexpected mode of action consisting in the inhibition of the GTase activity of the model enzyme PBP1b. In addition, selected compounds were able to specifically displace the lipid II from the active site in a fluorescence anisotropy assay, suggesting that they act as competitive inhibitors.

Keywords: peptidoglycan; Lipid II; PBP1b; squalamine; cationic aminosterols

1. Introduction

Peptidoglycan (PG) is an essential polymer of the bacterial cell wall that surrounds the cytoplasmic membrane, determines the cell shape and protects the cell from lysis. Its metabolism is a major antibacterial target. The PG structure consists of glycan strands made of alternating β -1,4-linked *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) residues cross-linked by peptides [1]. It is assembled using the lipid II precursor (undécaprényl-pyrophosphoryl-MurNAc- (pentapeptide)-GlcNAc) by the glycosyltransferases (GTases) activities of the class A penicillin-binding proteins (aPBPs) and SEDS (shape, elongation, division, and sporulation) proteins and cross-linked by the transpeptidases (TPases) activities of aPBPs and class B PBPs (bPBPs) [2–4]. The inhibition of each one of those activities leads to cell death [5].

The GTase domain of bifunctional class A PBPs, such as *Escherichia coli* PBP1b, belong to the GTase 51 family. The enzymatic cavity of these domains can be divided into two substrate binding sites: a donor site for the lipid-bound growing glycan chain, and an acceptor site for lipid II [6]. Moenomycin A is the only known natural product that specifically binds to the GTase 51 donor site and competitively inhibits PG synthesis [7]. It is a potent antibiotic that is not used in human therapy but was used in animal feedstock for decades without reported resistance [8].

Squalamine is a cationic aminosterol antibiotic, isolated from the dogfish shark (*Squalus acanthias*) [9] that exhibits a broad-spectrum antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria (MIC for *S. aureus* and *E. coli* ~ 3 µg/mL) and potentiates the activity of several antibiotic classes at subinhibitory concentrations, including against resistant bacteria [10]. Its structure is composed of a steroid linked to a polyamino spermidine moiety (Figure 1), which taken independently exhibit considerably low antibiotic activity and are both required for the observed antimicrobial activity of squalamine [9].

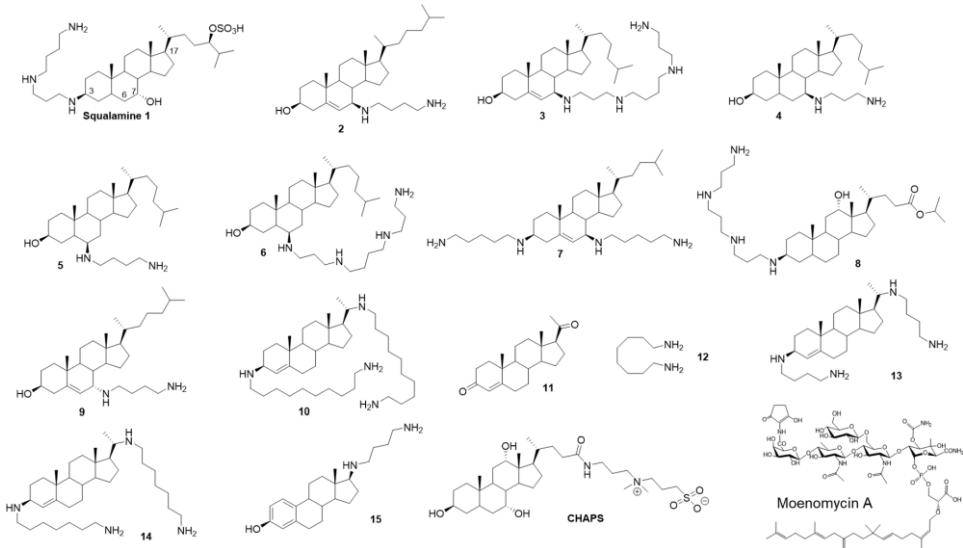


Figure 1. Structures of the aminosterol compounds used in this study and moenomycin A.

In the last decade, numerous aminosterol derivatives of squalamine have been synthesized and characterized [11–15]. Their mode of action was proposed to act by disrupting the outer membrane integrity of Gram-negative bacteria and by depolarizing the cytoplasmic membrane of Gram-positive bacteria [16,17]. Some of them display good membrane selectivity with high activity on bacterial membrane and low hemolytic activity, which make them promising candidates as new antibiotics or as adjuvants to sensitize resistant bacteria to well-known antibiotics [16,17].

Herein, we will demonstrate that squalamine and other related aminosterol present an unexpected additional mode of action, consisting of the inhibition of a bacterial PG polymerase. By using in vitro activity assays based on the processing of lipid II substrate into PG polymers by *E. coli* PBP1b, we found that squalamine and six other aminosterol analogs inhibit the GTase activity of this enzyme. In addition, the selected compounds were able to displace the lipid II from the active site in a fluorescence anisotropy assay indicating that they act as competitive inhibitors.

2. Results

1.1. Squalamine Inhibits the GTase Activity of PBP1b

The crystal structure of the GTase domain of the class A PBP1a from *Aquifex aeolicus* presents a steroidal CHAPS detergent molecule bound to a hydrophobic patch adjacent to the active site [18]. Its side chain was suggested to mimic and partly overlap with diphospholipid chain of the lipid II substrate in the acceptor site. We noticed that the aminosterol antibiotic squalamine and CHAPS have some structural feature in common, consisting essentially of a sterane core (Figure 1). We were curious to know if squalamine could affect the PG polymerase activity of *E. coli* PBP1b. Surprisingly, by using radioactive lipid II as substrate in an endpoint TLC assay we found that 0.8 mM squalamine was able to almost completely inhibit the GTase activity of PBP1b (1.1 ± 0.6% residual activity (RA)), whereas the aminosterol analogs 10, 13 and 14 were inactive (Figure 2A, Table 1). Variable concentrations of

squalamine were then tested using both an endpoint TLC assay and a continuous fluorescence assay that monitor the consumption of dansyl-lipid II substrate over time. The inhibition result shows concentrations-dependent profile and the efficacy of squalamine was rather modest in the high μ Molar range (IC_{50} value of $291 \pm 26 \mu$ M) (Figure 2B, Table 1). When the zwitterionic CHAPS detergent was tested using the same assay at high concentrations and below the critical micelle concentration (CMC 6–10 mM) value, no inhibition of PBP1b GTase activity was observed up to 5 mM (Figure 2C). In addition, steroid progesterone **11** or octanediamine **12** tested alone do not inhibit the GTase activity of PBP1b (Figure 1, Table 1).

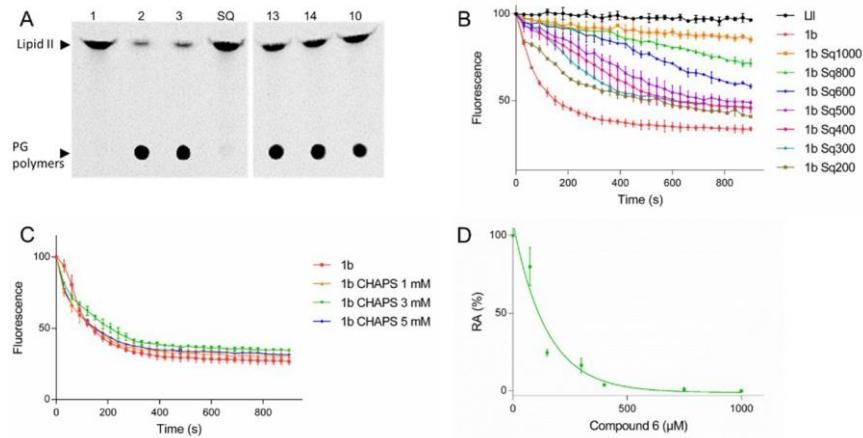


Figure 2. Inhibition of the GTase activity of PBP1b by squalamine and analogs. **(A)** TLC analysis of PG polymerase activity of PBP1b using radioactive lipid II as substrate, in the presence of squalamine and aminosterol analogs. Lanes: 1, lipid II incubated without enzyme; 2–3, lipid II incubated with 100 nM PBP1b with (2) or without (3) addition of methanol (because some compounds tested were solubilized in methanol); and SQ, 13, 14, and 10 depict the reaction incubated in the presence of 0.8 mM squalamine, or compounds **13**, **14** and **10**, respectively. **(B)** Inhibition of PBP1b GTase activity using increasing concentration of squalamine (200–1000 μ M) monitored by dansyl-lipid II based continuous fluorescence assay. **(C)** control experiment with CHAPS (1–5 mM). **(D)** a representative experiment of the RA in function of compound concentrations used for the determination of IC_{50} values. The error bars represent the mean values \pm s.d. of triplicate experiments.

Table 1. GTase inhibition activities of squalamine and aminosterol analogues.

Compounds	RA % (0.8 mM)	RA % (0.4 mM)	IC ₅₀ (μM)
Squalamine (1)	1.1 ± 0.6 0.3 ± 0.1	6 ± 2 1.2 ± 0.3	291 ± 26 114 ± 6
2			
3	8.5 ± 3.1	16 ± 2	220 ± 10
4	4 ± 1	39 ± 2	303 ± 15
5	3 ± 1	16 ± 1.4	221 ± 26
6	0.8 ± 0.4	3.9 ± 0.1	111 ± 6
7	1.5 ± 0.8	12.5 ± 4.4	229 ± 17
8	97 0.2	nd	nd
9	98 1	nd	nd
10	99 0.5	nd	nd
11	96 2	nd	nd
12	98 1	nd	nd
13	100	nd	nd
14	100	nd	nd
15	105 ± 3	nd	nd

RA = the residual GTase activities values of PBP1b in % of inhibition compared to nontreated control are shown for two compounds concentrations (400 and 800 μM). Both RA and IC₅₀ data represent mean values of three independent experiments ± s.d. nd, not determined. Squalamine (**1**) and analogues are in bold numbers (**2–15**).

1.2. Inhibition of the GTase Activity of PBP1b by Aminosterol Mimics of Squalamine

Based on these encouraging results we have analyzed twelve additional aminosterol compounds with one or more substitutions at C-3, C-6, C-7 and C-17 positions of the sterane rings. To determine the relative activity of the compounds, they were tested at 400 and 800 μM and ranked according to their effect on the residual activity (RA) of the enzyme. Six compounds were found to inhibit the GTase activity of PBP1b with residual activity ranging from 1.2 to 39% and from 0.3 to 8.5% when using compound concentrations of 400 and 800 μM, respectively (Figure 1, Table 1).

The active compounds were further investigated to determine the IC₅₀ values (Table 1). Compounds **2** and **6** were found to be the best ones with IC₅₀ values of 114 ± 6 μM and 111 ± 6 μM, respectively, about three times more efficient than squalamine. Interestingly, compound **9**, a stereoisomer of compound **2** at the C-7 position, was almost inactive (RA 98 % at 800 μM). All active compounds (except for squalamine) contain a nonpolar moiety in C-17 and a polar group at position C-3, C-6 or C-7. These results, together with the absence of activity of different analogues (**10**, **13**, **14** and **15**), indicate that the observed inhibitions of the GTase activity of PBP1b by squalamine and analogs are specific and exclude the possibility of promiscuous effect of these series of compounds.

1.3. Mode of Action of Aminosterol Compounds

The inhibition of the GTase activity can be achieved either by compounds that bind to the active site of the enzyme (e.g., moenomycin A) or through binding to the lipid II substrate (e.g., nisin, ramoplanin). To distinguish between these two mechanisms, we further characterized the mode of action of squalamine, the best inhibitory compound (**6**) and an inactive compound (**15**) by studying their interaction with PBP1b and lipid II, using a recently developed fluorescence anisotropy assay based on a fluorescent lipid II as a probe [19]. The assay was previously validated for direct interaction of the probe with PBP1b and with the antibiotics nisin and ramoplanin (FA increase upon binding), as well as the ability of unlabeled-lipid II, nisin or ramoplanin to displace

the probe from the enzyme active site (FA decreases in the presence of competitive compounds) [19]. While no significant interaction was observed between fluorescent lipid II and squalamine or compounds **6** and **15** (Figure 3B), the active compounds (squalamine and **6**) were able to compete with lipid II for binding to PBP1b, whereas the inactive compound **15** had no effect (Figure 3A). These results clearly indicate that the active aminosterol compounds directly interact with the GTase active site of PBP1b. All together the data reveal that squalamine and active analogs have multiple antibacterial modes of action, in addition to their potent membranes damaging activities, they also have modest cell wall synthesis inhibition activity.

3. Discussion

The prevalence of antibacterial resistance is increasing and new solutions should be developed urgently to deal with the resistant pathogens. The GTase activity of bifunctional PBPs is essential for bacterial viability and constitute a proven antibacterial target [20,21]. However, only one natural product antibiotic, moenomycin, that specifically binds to the active site of these enzymes was discovered more than 50 years ago [7,22], and therefore finding a new chemical scaffold able to bind and inhibit this class of enzymes is of great interest. In this regard, the discovery of the natural product squalamine, and synthetic analogues, that inhibit the GTase activity of the model class A PBP1b enzyme, from *E. coli* opens new perspectives for the development of a new class of GTase inhibitors. The identification of aminosterol derivatives with improved activity against the GTase, while maintaining some specific bacterial membranes damaging activity, could result in potent antibacterial agents, particularly against resistant Gram-negative bacteria.

Interestingly, FA experiments indicate that these compounds are competitive inhibitors able to displace the lipid II substrate from the GTase active site, but in contrast to moenomycin which binds only to the donor site and shows an increase in FA upon cooperative binding with lipid II substrate to PBP1b [19,23], the titration of the PBP1b-probe complex by aminosterol compounds induces a decrease in FA signal, similar to that observed in the presence of unlabeled lipid II, indicating that they prevent lipid II probe binding to both donor and acceptor sites.

A model of the potential binding mode of compound **2** was obtained by analogy with the *A. aeolicus* PBP1a structure in the presence of CHAPS (Figure 4A–C) [18]. The steroidal part of compound **2** binds on an equivalent hydrophobic patch on PBP1b, but it is rotated and slightly shifted so that the polar chain follows the same path as the CHAPS molecule. Interestingly, the amine extremity of the polar chain is then located in close proximity (3.3 Å) of the catalytic E290 residue. This binding mode would be conserved for active compound **3** to **7** that have their polar chain at the same position as compound **2** or on the adjacent carbon and longer polar chains would reach farther into the active site. For squalamine, it is not clear if the steroidal core would be shifted or the longer polar chain would follow a different path to reach E290.

As indicated above, these compounds seem to compete with the binding of lipid II in both the donor and acceptor sites. It is therefore not clear if a second binding site exists in the acceptor site or if the binding of aminosterol compounds to the donor site induces a conformational change (of the mobile region separating the two sites for example) that prevents the binding of lipid II to the acceptor site. The structure of PBP1b in complex with one of these compounds is therefore required to validate this hypothesis as well as the proposed binding mode.

Moenomycin has an excellent antibacterial potency and no reported resistance despite extensive use in animal feeds, but it is not used in human therapy because of its undesirable physical properties that result in poor bioavailability and long serum half-life, probably due to its lipidic C₂₅ moenocinol moiety [8,24,25]. This lipid tail is necessary for moenomycin activity and its replacement by an alternative one could improve the properties of the resulting molecule. The C₂₅ lipid tail of moenomycin was not resolved in any crystal structure of GTase-moenomycin complexes, indicating that it does not adopt an ordered conformation [6,26]. In contrast, CHAPS was well defined in the structure of the GTase domain of PBP1a from *A. aeolicus* [18] suggesting that binding of the cyclic steroid-substituted compounds would provide a defined structure and facilitate structure-based optimization of compounds.

Most of GTase inhibitors (moenomycin and synthetics compounds) are inactive against Gram-negative bacteria [21]. On the other hand, aminosterols have the capacity to cause lesions in the outer membrane and either kill, or sensitize Gram-negative resistant strains to common antibiotics. Therefore, it is tempting to speculate that aminosterol compounds may be useful substitutes for the lipid moenocinol part of moenomycin (or to the lipid tail of lipid II analogs [27]) to generate useful new hybrid compounds, consisting of the carbohydrate and phosphoglycerate moieties or the minimal moenomycin pharmacophore (disaccharide (EF)-phosphoglycerate [21]) and an aminosterol tail (Figure 4). Such compounds would have two functions: (i) to replace the lipid tail of moenomycin

derivatives while maintaining their binding to the GTase active site; and (ii) to allow these compounds to cross the outer membrane (via the polyamine cationic moiety) and gain effectiveness against Gram-negative pathogens.

Figure 4. Model of the potential binding mode of compound **2** on the GTase domain of PBP1b (PDB code 5HLB). **(A)** Cartoon representation of PBP1b, with the TGase domain in grey, the trans-membrane segment in pale orange, the UB2H domain in pink and the TPase domain in blue. Moenomycin A and compound **2** are represented as yellow and cyan sticks respectively. The catalytic E290 is shown as green sticks. **(B)** Same as **(A)** with a rotation of approximately 90° and a CHAPS molecule represent as back lines. **(C)** Same as **(B)** with PBP1b represented as a surface. The red patch indicates the position of the accessible Oε from E290.

4. Conclusions

Squalamine and cationic aminosterol analogues are broad-spectrum antibiotics that target bacterial membranes. We now show that some of these compounds have an additional mode of action consisting of the inhibition of the glycosyltransferase activity of PBP1b. This finding opens new perspectives for the development of new class antibiotics against the GTase, which is considered an important antibacterial target

Publication 5

Remarque: J'ai contribué à ce travail au travers de l'étude des interactions entre les deux protéines à domaine SPOR (DamX et DedD) et les deux PBPs de classe A (PBP1a et PBP1b).



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY



SPOR Proteins Are Required for Functionality of Class A Penicillin-Binding Proteins in *Escherichia coli*

Manuel Pazos,^a Katharina Peters,^a Adrien Boes,^b Yalda Safaei,^c Calem Kenward,^c Nathanael A. Caveney,^d Cedric Laguri,^e Eefjan Breukink,^f Natalie C. J. Strynadka,^c Jean-Pierre Simorre,^e Mohammed Terrak,^b Waldemar Vollmer^a

^aCentre for Bacterial Cell Biology, Biosciences Institute, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom

^bInBioS-Centre d'Ingénierie des Protéines, Liège University, Liège, Belgium

^cBiochemistry and Molecular Biology and Centre for Blood Research, The University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

^dDepartment of Molecular and Cellular Physiology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA

^eUniversity of Grenoble Alpes, CNRS, CEA, IBS, Grenoble, France

^fMembrane Biochemistry and Biophysics, Department of Chemistry, Faculty of Science, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

Manuel Pazos and Katharina Peters contributed equally to this work. Author order was determined alphabetically.

ABSTRACT Sporulation-related repeat (SPOR) domains are present in many bacterial cell envelope proteins and are known to bind peptidoglycan. *Escherichia coli* contains four SPOR proteins, DamX, DedD, FtsN, and RlpA, of which FtsN is essential for septal peptidoglycan synthesis. DamX and DedD may also play a role in cell division, based on mild cell division defects observed in strains lacking these SPOR domain proteins. Here, we show by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy that the periplasmic part of DedD consists of a disordered region followed by a canonical SPOR domain with a structure similar to that of the SPOR domains of FtsN, DamX, and RlpA. The absence of DamX or DedD decreases the functionality of the bifunctional transglycosylase-transpeptidase penicillin-binding protein 1B (PBP1B). DamX and DedD interact with PBP1B and stimulate its glycosyltransferase activity, and DamX also stimulates the transpeptidase activity. DedD also binds to PBP1A and stimulates its glycosyltransferase activity. Our data support a direct role of DamX and DedD in enhancing the activity of PBP1B and PBP1A, presumably during the synthesis of the cell division septum.

IMPORTANCE *Escherichia coli* has four SPOR proteins that bind peptidoglycan, of which FtsN is essential for cell division. DamX and DedD are suggested to have semiredundant functions in cell division based on genetic evidence. Here, we solved the structure of the SPOR domain of DedD, and we show that both DamX and DedD interact with and stimulate the synthetic activity of the peptidoglycan synthases PBP1A and PBP1B, suggesting that these class A PBP enzymes act in concert with peptidoglycan-binding proteins during cell division.

KEYWORDS SPOR domain, cell division, peptidoglycan, peptidoglycan synthases

Citation Pazos M, Peters K, Boes A, Safaei Y, Kenward C, Caveney NA, Laguri C, Breukink E, Strynadka NCJ, Simorre J-P, Terrak M, Vollmer W. 2020. SPOR proteins are required for functionality of class A penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *mBio* 11:e02796-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02796-20>.

Editor Kimberly A. Kline, Nanyang Technological University

Copyright ©2020 Pazos et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](#).

Address correspondence to Manuel Pazos, Manuel.Pazos@newcastle.ac.uk, or Waldemar Vollmer, Waldemar.Vollmer@newcastle.ac.uk.

This article is a direct contribution from Waldemar Vollmer, a fellow of the American Academy of Microbiology, who arranged for and secured reviews by William Margolin, McGovern Medical School, and Juan Hermoso, Spanish National Research Council-CSIC.

The peptidoglycan (PG) sacculus is an essential net-like polymer that surrounds the cytoplasmic membrane in most bacteria (1, 2). Although elastic, the sacculus is rigid enough to maintain the shape of a bacterial cell and protect it from bursting due to turgor. In *Escherichia coli*, the PG sacculus forms a thin,

mostly single layer in the periplasm. PG is composed of linear glycan strands made of alternating *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylmuramic acid residues which are connected by short stem peptides containing L- and D-amino acids (3). The glycan strands are polymerized from lipid II precursor by glycosyltransferases. The most abundant peptide cross-links connect D-Ala at position 4 of one peptide with meso-diaminopimelic acid (mDAP) at position 3 of another. These cross-links are synthesized by DD-transpeptidases called penicillin-binding proteins (PBPs), which are the primary target of *b*-lactam antibiotics. Most *b*-lactams target several PBPs, but some are more specific; for example, aztreonam selectively inhibits PBP3 (4), amdinocillin inhibits PBP2, and cefsulodin inhibits PBP1A and PBP1B (5), albeit with an 8-fold-higher affinity for PBP1A.

During the cell cycle, the PG sacculus is first enlarged during cell elongation and then split into two during cell division. Sacculus growth and division require the coordinated actions of synthetic and hydrolytic PG enzymes, while the structural integrity of the sacculus and the whole cell envelope has to be preserved at all times (6, 7). The current model suggests that dynamic multienzyme complexes, called elongasomes (or rod complexes) and divisomes, facilitate the enlargement of the sacculus during growth and cell division (8, 9). Many components of the elongasome and divisome complexes are known, but the molecular mechanisms by which these complexes function in the cell are largely unknown (6, 7).

The divisome synthesizes the cell division septum and separates the two daughter cells. The cytosolic tubulin homolog FtsZ localizes first at the future cell division site and scaffolds the recruitment of the other cell division proteins, initially by a diffusion-and-capture mechanism (10). Multiple short FtsZ filaments treadmill around the cell (Z-ring), attached to the cytoplasmic membrane by ZipA and FtsA. PBP1A and PBP1B localize to these developing division sites to insert new PG at the lateral walls in a process known as preseptal PG synthesis or PIPS (PBP3-independent PG synthesis) (11, 12). Preseptal PG synthesis takes place before septation and constriction are observed (13). Later during septation, FtsQLB and FtsN are required for the activation of septal PG synthesis (14–16), which is catalyzed by FtsW (glycosyltransferase [GTase]), PBP3 (transpeptidase [TPase]) and PBP1B or PBP1A (GTase and TPase) (17–20). Separation of the two daughter cells requires the hydrolysis of septal PG mainly by the amidases AmiA, AmiB, and AmiC, which remove stem peptides to form denuded glycan strands (21). The recruitment of EnvC (activator of AmiA and AmiB) and NlpD (activator of AmiC) to preseptal positions is essential for the temporal and spatial regulation of the amidase activity (22, 23) and therefore for correct cell constriction and separation. Lytic trans-glycosylases (LT) and DD-endopeptidases also contribute to septal PG hydrolysis; these cleave within the glycan strands and hydrolyze DD-cross-links, respectively (24, 25).

There are many nonessential proteins, often with unknown or seemingly redundant functions for sacculus growth, and these might be necessary to ensure robust growth and maintenance of the integrity of the sacculus under changing environmental conditions (26). Here, we focus on a family of proteins containing a SPOR (sporulation-related repeat) domain. These SPOR proteins bind peptidoglycan and are widely conserved among bacteria (27). Recent structural work explained their ability to bind denuded glycan strands (28). In *E. coli*, the SPOR proteins localize to division septa when amidases are present and show a stronger septal localization signal in mutants lacking lytic transglycosylases, supporting their binding to denuded glycan strands (29). *E. coli* contains four SPOR proteins, DamX, DedD, RlpA, and FtsN, of which only FtsN is essential for cell division and viability (Fig. 1) (30, 31). None of the *E. coli* SPOR proteins have been reported to have an enzymatic activity, but the RlpA homologue in *Pseudomonas aeruginosa* is an LT that acts on denuded glycan strands (32). The best-characterized SPOR protein is FtsN, which interacts with peptidoglycan (33), the cell division protein FtsA (34, 35), and the septal PG synthases PBP3 and PBP1B, stimulating both GTase and TPase synthetic activities of the latter (36). Genetic evidence supports a role for both DamX and DedD in cell division. The deletion of *damX* or *dedD* either has no detectable phenotype or causes mild cell chaining, but the lack of both genes results in a more severe cell division defect and filamentation (30, 31). The overproduction of DamX inhibits cell division and, consequently, leads to cell filamentation and death (37). DedD becomes essential in cells containing an FtsN version lacking the SPOR domain (FtsN^{slm117}), a partially functional allele that supports cell viability (30). The SPOR domain of DedD is dispensable, but its transmembrane region and the adjacent periplasmic residues appear to be important for its function (38).

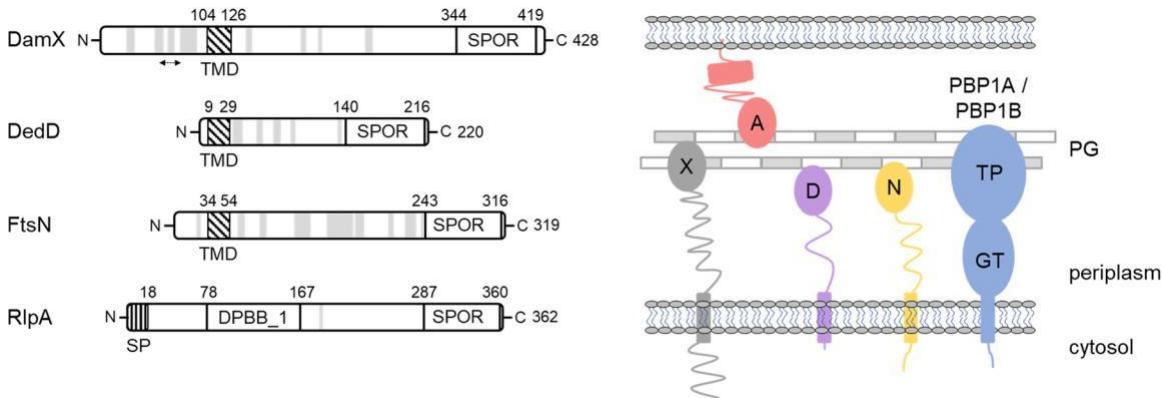


FIG 1 SPOR domain containing proteins in *E. coli*. (Left) Domains of each protein and their defining residues according to UniProt and Pfam. Potential *a*-helices (GOR secondary structure prediction method version IV) (53) are represented as light gray bands and the predicted coiled-coil as a double-headed arrow. TMD, transmembrane region; SPOR, SPOR domain; SP, signal peptide; DPBB_1, double-psi beta barrel; N, amino terminus; C, carboxyl terminus. (Right) Schematic representation of the SPOR proteins and the PG synthases PBP1A and PBP1B. X, DamX; A, RlpA; D, DedD; N, FtsN.

How DamX and DedD affect cell division and what their function is during septation are currently unknown. In this work, we provide the first genetic and biochemical evidence supporting a direct role of DamX and DedD in enhancing the activity of PBP1B and, in the case of DedD, the activity of PBP1A.

RESULTS

Solution-state structure of *E. coli* DedD. SPOR domain protein structures have been determined for two of the four proteins in *E. coli*: FtsN (PDB ID [1UTA](#)) (39) and DamX (PDB ID [2LFV](#)) (40). Additionally, structures of the *P. aeruginosa* homologue of RlpA, both in the apo form and in complex with denuded glycans (PDB IDs [6I05](#), [6I09](#), [6I0N](#), and [6I0A](#)) (28), and the sporulation-specific CwlC from *Bacillus subtilis* (PDB ID [1X60](#)) (41) have been determined. In the context of SPOR proteins that exist in *E. coli*, only DedD has not been structurally characterized. We therefore decided to pursue the structure of *E. coli* DedD via nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to provide structural context for our functional study of the role of SPOR proteins in *E. coli*.

An NMR-based approach was required due to the predicted combination of both structured and intrinsically disordered regions in DedD (38). The ^1H - ^{15}N correlation spectrum of ^{15}N -labeled DedD (residues 28 to 220 with a single transmembrane region removed) displayed both disperse peaks and intense narrow peaks with a very low ^1H chemical shift dispersion, confirming the presence of structured and unstructured regions (Fig. 2A; Table S1 and Fig. S1, S2, and S3). ^1H - ^{15}N nuclear Overhauser effect (NOE) relaxation measurements displayed positive NOE values (0.6) for residues 144 to 220, in agreement with the presence of a globular and stable SPOR domain (Fig. 2A). Residues 36 to 141 produced low or negative NOE values, which indicate fast motion, and residues 142 and 143 showed transitional values between the structured and unstructured regions of DedD (Fig. 2A). Therefore, we confirm that the solution-state structure of DedD is that of a structured SPOR domain tethered to the inner membrane via an unstructured and flexible linking region.

For the ordered and folded region of DedD, we were able to fully determine the structure. We found that residues 143 to 220 form a canonical SPOR domain consisting of a four-stranded antiparallel *b*-sheet flanked on one side by a pair of *a*-helices (Fig. 2B). On the fold level, we observe high structural similarity among all five SPOR domains that have been determined. At an atomistic level, we observe that DedD has backbone root mean square deviation (RMSD) values of 1.1, 1.4, 0.9, and 1.0 Å across 19, 17, 25, and 38

trimmed residues for FtsN, DamX, RlpA, and CwlC, respectively (Fig. 2C). This level of atomistic variability is mostly observed in the pair of *a*-helices that act to scaffold the *b*-sheet, while the *b*-sheet itself is more structurally conserved. This is

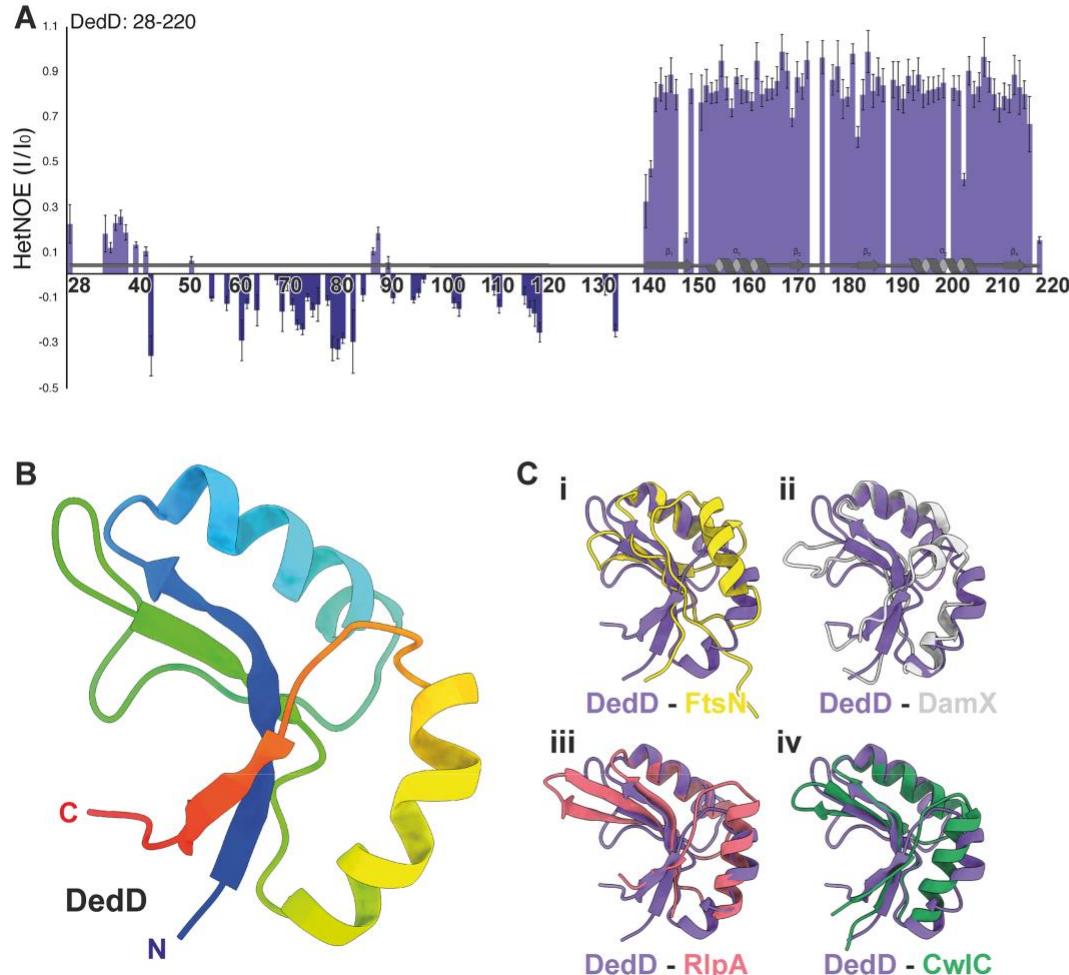


FIG 2 Structure of *E. coli* DedD. Heteronuclear ^1H - ^{15}N NOE (HetNOE) ratios between saturated and reference experiments for DedD. (A) ^1H - ^{15}N heteronuclear NOE of ^{15}N -labeled DedD (residues 28 to 220) with secondary structuring based on the final structure. Residues within the structured region (K142 to N220) are ordered on the picosecond-to-nanosecond timescale, as indicated by an NOE value of 0.6, which is clearly differentiated from the flexible C-terminal region (D28 to K142). (B) Structured regions are depicted as a ribbon diagram with secondary structure elements shown, colored in rainbow from the N terminus (blue) to the C terminus (red). The SPOR domain regions of (i) *E. coli* FtsN (yellow; PDB.ID [1UTA](#)) (39), (ii) *E. coli* DamX (gray; PDB.ID [2LFV](#)) (40), (iii) *P. aeruginosa* RlpA (red; PDB.IDs [6I05](#)) (28), and (iv) *B. subtilis* CwlC (green; PDB.ID [1X60](#)) (41) aligned to the structured SPOR domain region of *E. coli* DedD (C). In each case, DedD is in purple.

perhaps unsurprising, as the *b*-sheet region was seen to form the majority of the binding interface in the liganded structures of *P. aeruginosa* RlpA (28). To further unravel the potential similarities and differences in the binding mode of DedD in comparison to other SPOR proteins, we generated a model of liganded DedD. In this model, we superimposed the apo NMR structure of DedD on the glycan-liganded crystal structure of RlpA (PDB ID 610A) (28). We see that the binding mode is very similar to that of RlpA, and as previously proposed for CwlC and FtsN models (28). This binding involves key conserved residues in the exposed basic, electropositive binding cleft (Fig. S4), such as Q147 (Q270 in RlpA), as well as analogous residues, such as L151 in place of F274 of RlpA. However, the modeled liganded DedD lacks the additional contributions from the nonconserved W365 and W416, as observed in the proposed model for DamX binding of the ligand (28). Overall, the observed conservation of the SPOR domains and structural organization suggest a shared functional overlap and interactions with other proteins involved with peptidoglycan and cell division, particularly the PG synthases.

The absence of SPOR proteins increases the sensitivity to cefsulodin. We hypothesized that the SPOR proteins are required for the correct functionality of PBP1B

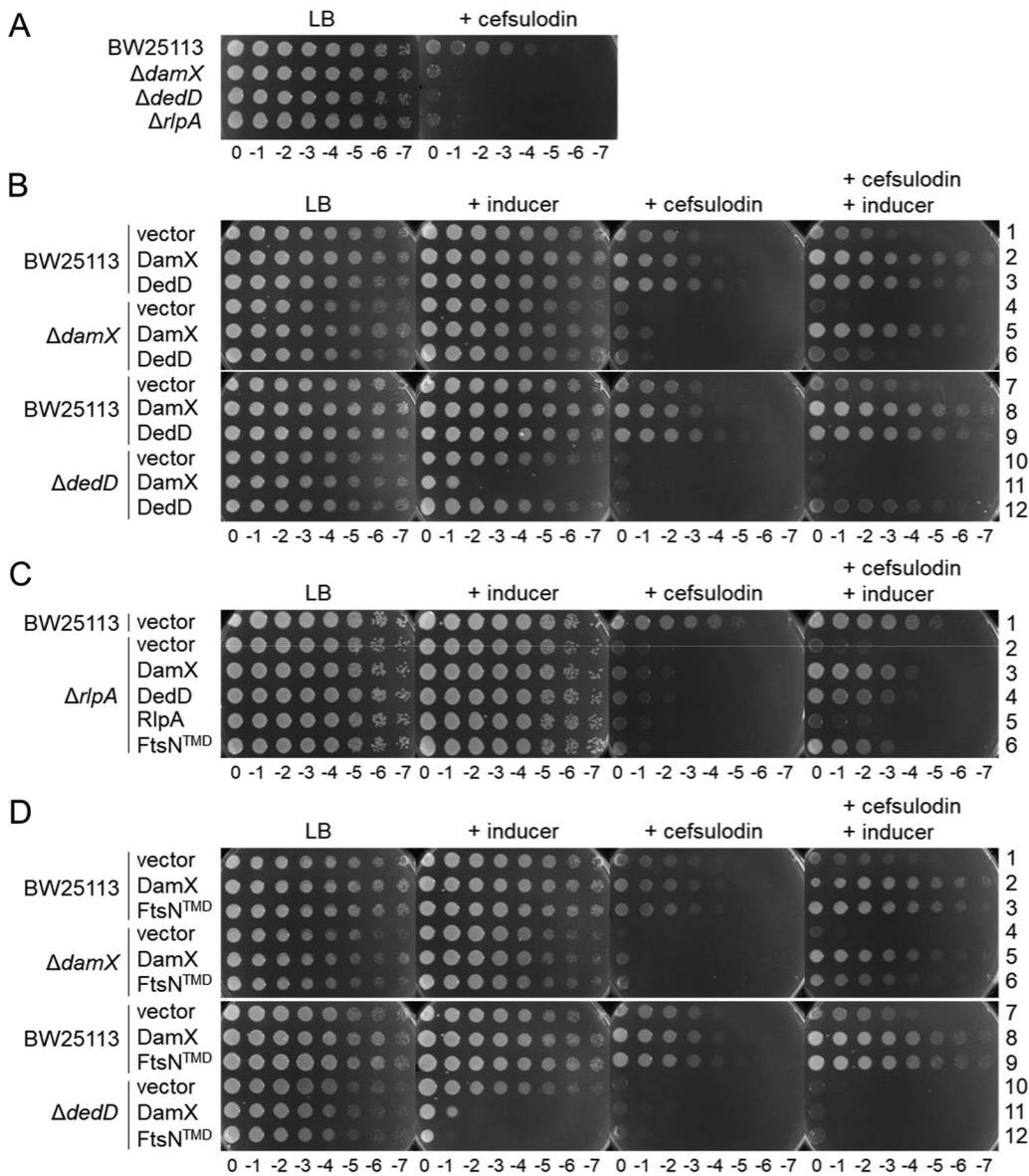


FIG 3 The absence of SPOR domain proteins increases the sensitivity to cefsulodin. (A) Plate spotted with tenfold serial dilutions of the indicated strains in the presence or absence of cefsulodin. (B) Overproduction of plasmid encoded DamX or DedD in wild-type, *damX*, or *dedD* cells in the presence or absence of cefsulodin and/or inducer. (C) Overproduction of plasmid-encoded DamX, DedD, RlpA, or DamX with the transmembrane region of FtsN (FtsN^{TMD}) in wild-type or *rlpA* cells in the presence or absence of cefsulodin and/or inducer. (D) Overproduction of plasmid encoded DamX or FtsN^{TMD} in wild-type, *damX*, or *dedD* cells in the presence or absence of cefsulodin. For all panels: cefsulodin was used at 30 mg ml⁻¹, the inducer sodium salicylate was used at 10 mg ml⁻¹.

in *E. coli*, based on the decrease in fitness of the single-knockout mutants when grown in the presence of cefsulodin, as revealed by a chemical genomics screening (42). Cefsulodin is a *b*-lactam with high affinity for PBP1A and therefore a suitable tool to assess the functionality of PBP1B, as *E. coli* requires at least one of these class A PBPs for viability (43). First, we confirmed the increased susceptibility to cefsulodin of the mutants with single knockouts of DamX, DedD, and RlpA (Fig. 3A), suggesting that all three proteins enhance the functionality of PBP1B in the cell. Complementation of the knockout strains by expression of the plasmid-borne genes showed that oligohistidine-tagged DamX and DedD restored the wild-type level of cefsulodin resistance (Fig. 3B, rows 5 and 12). The overexpression of the oligohistidine-tagged RlpA did not complement the mutation (Fig. 3C, row 5), suggesting that the tag interfered with the function of RlpA.

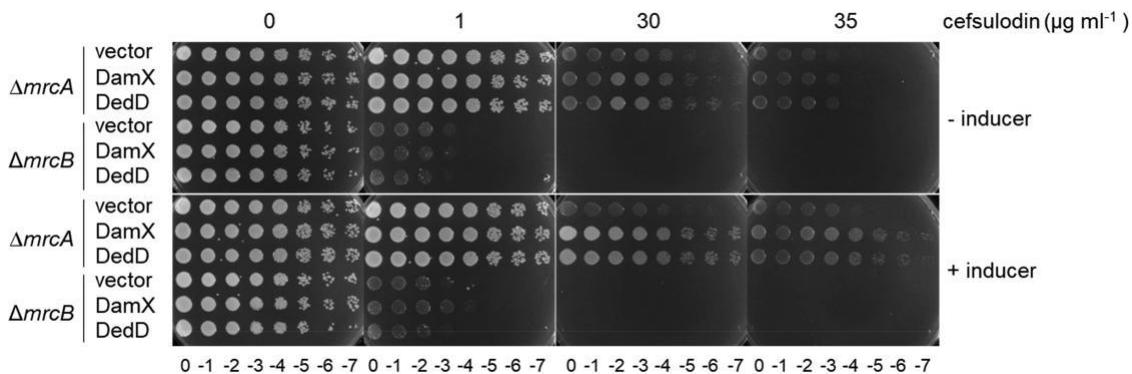


FIG 4 DamX and DedD enhance cellular PBP1B functionality. Tenfold serial dilutions of *mrcA* or *mrcB* cells overproducing the full-length plasmid-encoded DamX or DedD proteins were spotted on a plate at different cefaclor concentrations. Inducer, 10 μ g ml $^{-1}$ sodium salicylate.

A polar effect of the *rlpA* deletion on adjacent genes is unlikely, because the overexpression of DamX or DedD largely restored cefaclor resistance (Fig. 3C, rows 3 and 4). Our further investigations focused mainly on DamX and DedD.

To study the possible redundant roles of DamX and DedD, we also tested the effect of their overexpression in wild-type cells and mutants lacking other SPOR proteins. The expression of plasmid-borne *damX* or *dedD* increased the resistance to cefaclor in wild-type cells (Fig. 3B, rows 2, 3, 8, and 9), again supporting their positive effect on the functionality of PBP1B. In the absence of RlpA, the overproduction of DamX or DedD partially restored the resistance to cefaclor (Fig. 3C, rows 3 and 4). DedD overproduction could partially complement the absence of *damX* (Fig. 3B, row 6), but, interestingly, DamX overproduction was lethal in *dedD* cells (Fig. 3B, row 11). Together, these results suggest that both DamX and DedD are functionally semiredundant but the ratio of DamX to DedD is critical in the cell.

We then aimed to express different truncated versions of DamX to identify the region of the protein required for the observed effect on cefaclor sensitivity (Fig. S5). However, the truncated DamX versions were unstable in the cell, and the overproduced proteins could not be detected by Western blot analysis using antibodies against the oligohistidine tag (Fig. S6). We were able to detect an overproduced DamX version containing the transmembrane region of FtsN instead of its own. Cells overproducing this DamX version enhanced the resistance to cefaclor similarly to wild-type DamX (Fig. 3C, row 6, and Fig. 3D, rows 3 and 6; Fig. S5 and S6) and showed similar toxicity in *dedD* cells (Fig. 3D, row 12).

Because the cell requires at least one of the two main class A PBPs for survival, we overproduced DamX or DedD in cells lacking either PBP1A or PBP1B. We used cefaclor at a concentration of 1 μ g ml $^{-1}$ for cells lacking PBP1B (*mrcB*) and 30 μ g ml $^{-1}$ for cells lacking PBP1A (*mrcA*). The overproduction of DamX or DedD increased the resistance to cefaclor of cells lacking PBP1A (*mrcA*) but not of cells lacking PBP1B (*mrcB*) (Fig. 4), supporting the notion that a higher level of DamX or DedD enhances the functionality of PBP1B.

PBP1A and/or PBP1B are required to incorporate new peptidoglycan at the lateral cell wall of the future cell division site during the preseptal cell elongation phase (11). The SPOR domains of DamX and DedD are also recruited to these preseptal positions, forming ring-like structures (30). Preseptal PG synthesis is most pronounced in cells treated with aztreonam, which inhibits PBP3, the essential TPase required for the septum formation at the division site. We tested whether the MIC of aztreonam is altered when the functionality of PBP1B is reduced. Cells lacking PBP1B showed higher susceptibility to aztreonam than cells lacking PBP1A, as previously reported (44), but the absence of DamX did not alter the susceptibility to aztreonam in cells lacking PBP1A or PBP1B (Fig. S7). Together, these results show that the reduced functionality of PBP1B in the *damX* mutant manifests specifically in the presence of cefsulodin and is independent of PBP3 activity.

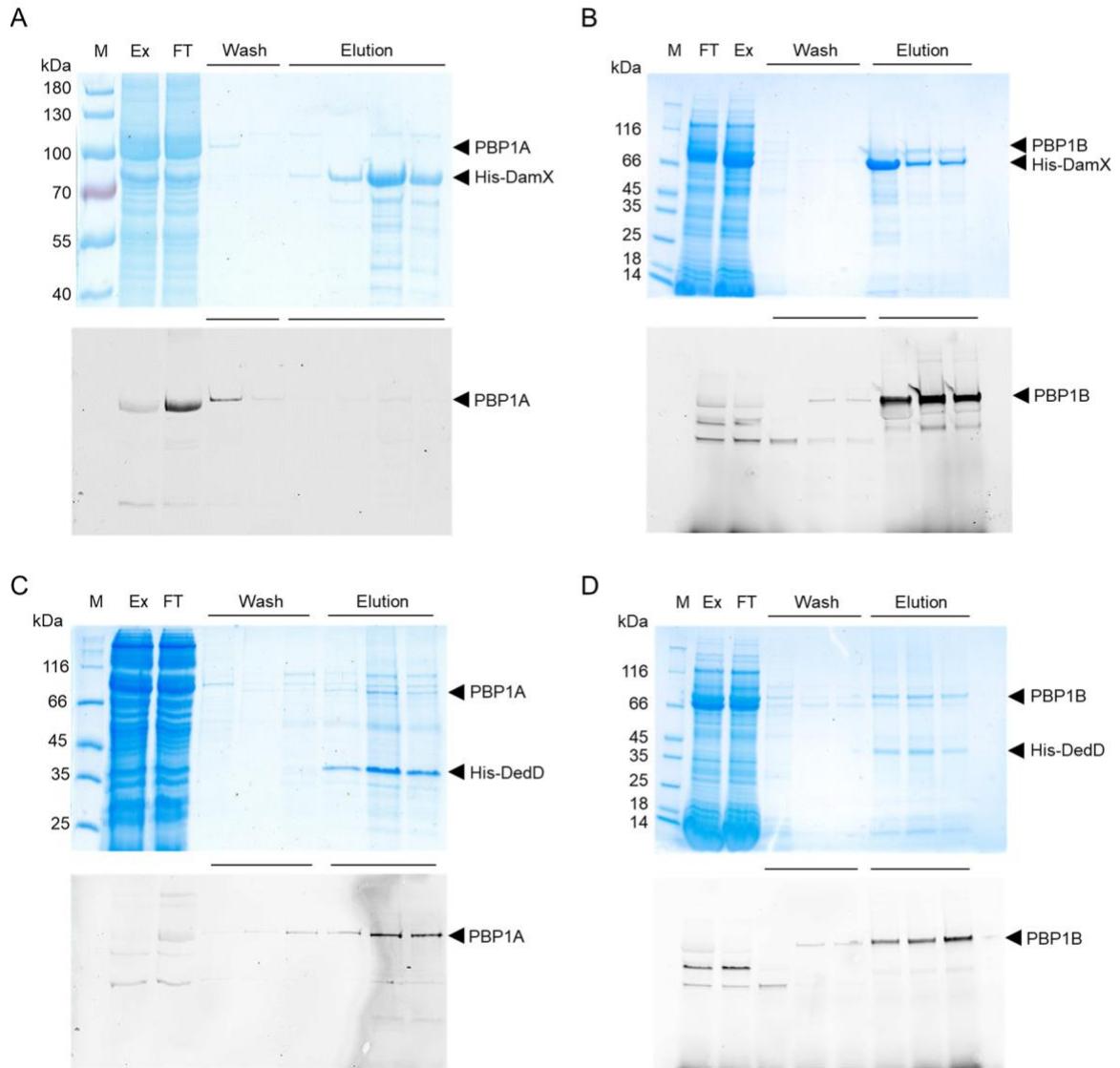


FIG 5 Interactions between SPOR proteins and class A PBPs. The proteins were coexpressed in *E. coli* and copurified on a nickel affinity column with a His tag on the SPOR protein used as bait. The PBPs were labeled using Bocillin FL followed by analysis of the samples by SDS-PAGE, fluorescence imaging (bottom), and Coomassie blue staining (top). The expressed protein pairs are indicated by arrowheads: His-DamX and PBP1A (A), His-DamX and PBP1B (B), His-DedD and PBP1A (C), and His-DedD and PBP1B (D). M, protein marker; Ex, protein extract fraction; FT, flowthrough fraction. The wash and elution fractions are indicated with horizontal lines.

Interactions between SPOR proteins and PBP1A or PBP1B. To study the interaction between SPOR proteins and the class A PBPs, protein couples were coexpressed from a pETDuet plasmid into the membranes of the *E. coli* host, solubilized with DDM (*N*-dodecyl *b*-D-maltoside) detergent and copurified by affinity chromatography on a nickel-nitrilotriacetic acid (NTA) column, making use of an N-terminal His tag on the SPOR protein. The purified fractions were labeled with Bocillin FL and analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by fluorescence imaging and Coomassie blue staining. The results show that PBP1B coeluted with His-DamX, while PBP1A was found only in the wash fraction (Fig. 5A and B). This suggests that DamX binds PBP1B and that the binding of DamX to PBP1A is either weak or absent. His-DedD copurified with both PBP1A and PBP1B, indicating that it interacts with both PBPs (Fig. 5C and D).

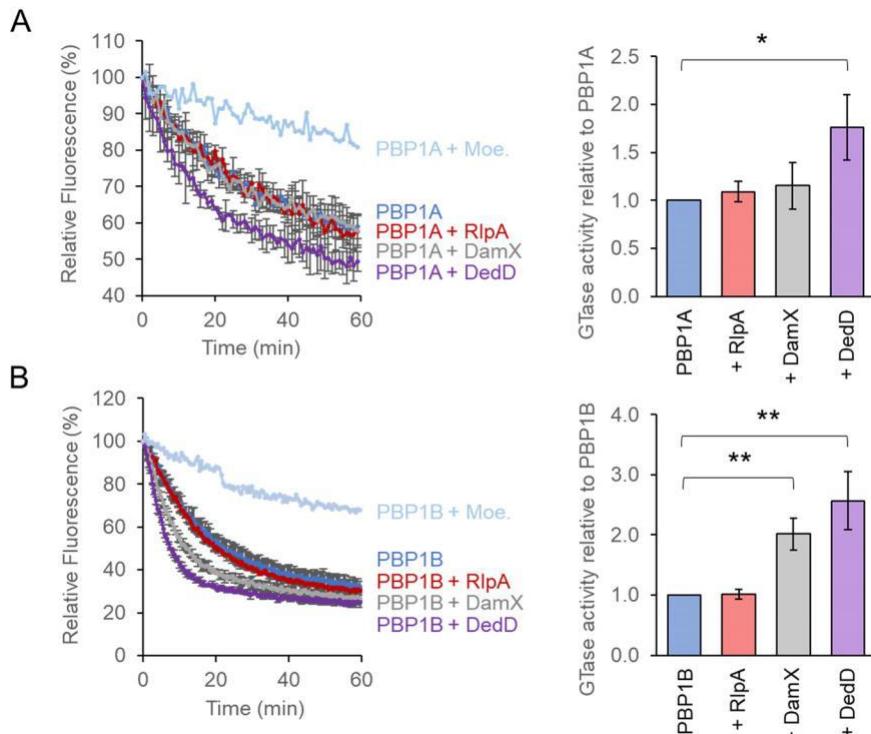


FIG 6 Effect of SPOR proteins on the GTase activity of PBPs. Consumption of fluorescent lipid II by the GTase activity of PBP1A (A) or PBP1B (B) in the presence of the indicated proteins. The GTase rates are shown as the decrease in fluorescence over time. Values are means and standard deviations from three independent experiments, after normalizing to the values for PBP1A or PBP1B alone. Student's *t* test (two-tailed) was used for statistical analysis (*, *P* 0.05; **, *P* 0.01). Moe., moenomycin.

SPOR proteins stimulate PBP1A and PBP1B. We next tested if the SPOR proteins affect the GTase and TPase activities of PBP1A and PBP1B using three different *in vitro* PG synthesis assays. The first assay quantifies the consumption of fluorescent dansyl-lipid II. Both SPOR proteins had different, mild effects on the two synthases. DedD increased the GTase rate of PBP1A 1.8- 0.3-fold, but DamX had no effect (Fig. 6A). DedD and DamX stimulated the GTase of PBP1B to similar extents (DedD, 2.6- 0.5-fold; DamX, 2.0- 0.3-fold) (Fig. 6B). RlpA shows no effect on the GTase activity of PBP1A or PBP1B (Fig. 6A and B).

To estimate the TPase activity we quantified the percentage of cross-linked peptides present in the reaction products of an endpoint assay. Radiolabeled lipid II was used as the substrate, and the products were separated by high-pressure liquid chromatography (HPLC). We observed no significant changes in the percentage of cross-links produced by PBP1A or PBP1B (Fig. 7A and B, respectively) in the presence or absence of a SPOR protein.

We also tested the effect of the SPOR proteins on the activities of PBP1A and PBP1B when the synthases were present at low concentration, presumably in a less active monomeric state (19, 36). Using the HPLC-based endpoint assay, we observed no effect on the activity of PBP1A by any of the SPOR proteins (Fig. 8A). In the case of PBP1B, we observed that the addition of DedD increased the monomeric GTase product peak (Penta; compound 2) but less so the cross-linked GTase-TPase product peak (TetraPenta; compound 3) (Fig. 8B). The presence of DamX increased both Penta and TetraPenta products, resulting in an almost complete consumption of the lipid II substrate (Fig. 8B). A soluble version of DamX lacking the transmembrane region (sDamX) did not stimulate the GTase and TPase activities of PBP1B (Fig. 8B), suggesting that the transmembrane region of DamX is required for stimulation. The stimulation of PBP1B by DamX took place regardless of the N- or C-terminal position of the His tag in

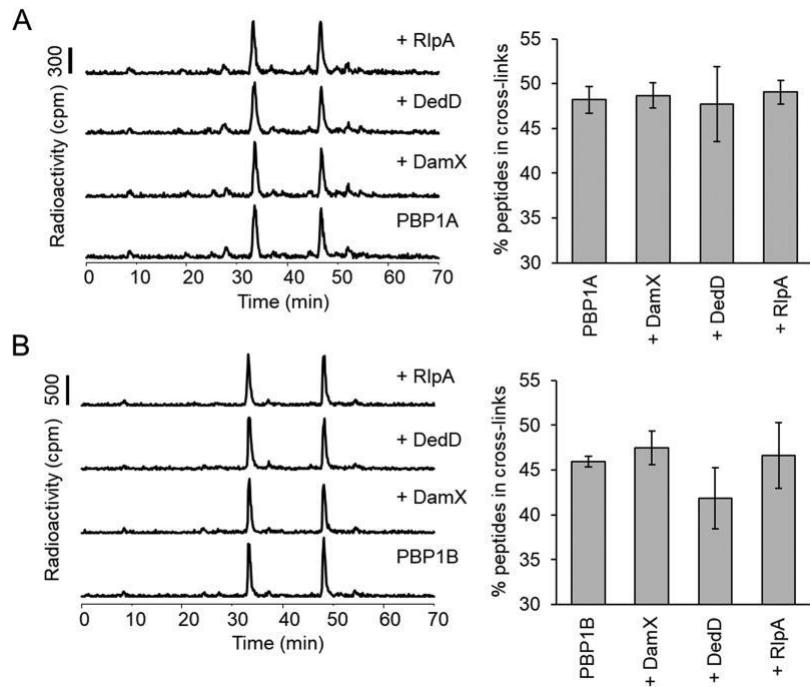


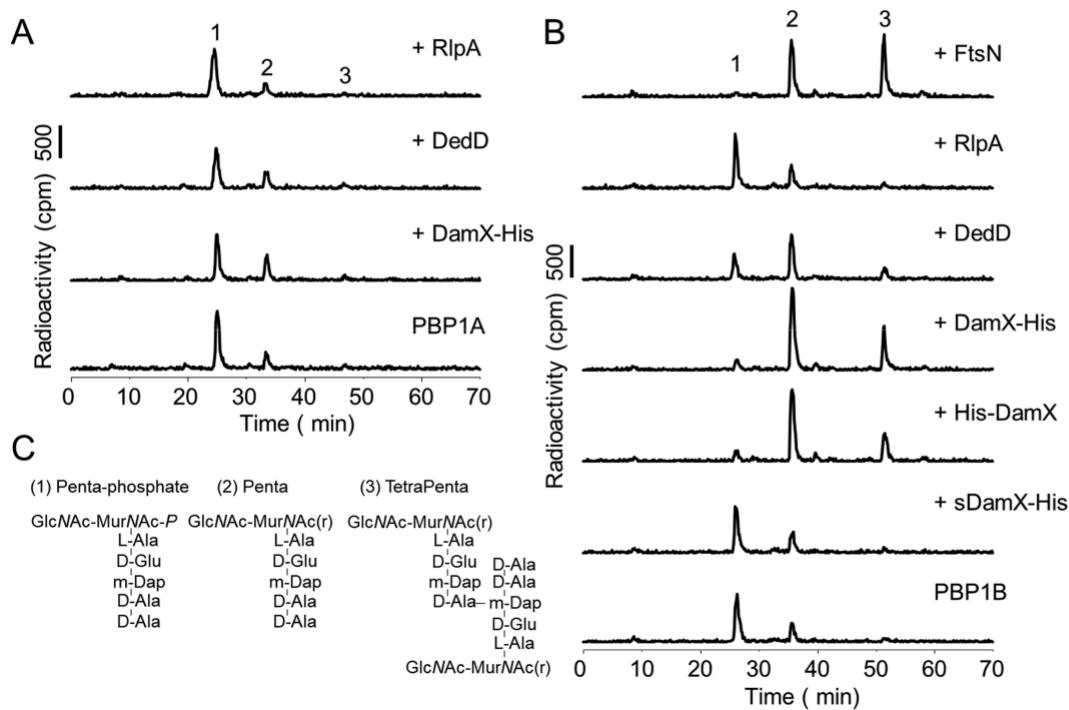
FIG 7 Effect of SPOR proteins on the TPase activity of PBPs. Representative HPLC chromatograms of PBP1A (A) and PBP1B (B) *in vitro* PG synthesis reactions using radioactive lipid II as the substrate in the presence of the indicated proteins. The synthesized PG was digested with cellosyl, reduced with sodium borohydride, and analyzed by HPLC. TPase activities (right) were determined by the percentage of peptides in cross-links present in the reaction products. The values are means and standard deviations from three independent experiments.

the purified protein. We confirmed the previously reported stimulation of PBP1B by FtsN, which was stronger than the stimulation of PBP1B by DamX, as observed by the higher consumption of the lipid II substrate (Fig. 8B, compound 1) and higher abundance of the TetraPenta product (compound 3). The structures of the main reaction products are shown in Fig. 8C.

We also assessed the GTase activity of PBP1B using fluorescently labeled lipid II substrate, in the presence of ampicillin, and separated the produced glycan strands by SDS-PAGE. We observed an increase in the amount of glycan strand products with DamX but not RlpA or DedD (Fig. 9A). DamX with the His tag at the C terminus and DamX with the His tag at the N terminus gave similar results, but the DamX version without the transmembrane region did not stimulate PBP1B (sDamX) (Fig. 9B). Again, FtsN stimulated the GTase activity of PBP1B more strongly than DamX, consistent with our results obtained with the other assays (Fig. 9A). As expected, control reaction mixtures containing RlpA, DedD, or the different DamX proteins in the absence of PBP1B showed no GTase products (Fig. 9A and B), excluding the presence of contaminating GTases in the purified protein samples. To summarize, our activity assays showed that DamX and DedD stimulate the activity of PBP1B and, in the case of DedD, also the activity of PBP1A.

DISCUSSION

This work identified a direct role for the SPOR proteins DamX and DedD in the function of PG synthases. The absence of DamX or DedD decreased the functionality of PBP1B in the cell, leading to an increase in the susceptibility to cefsulodin, which primarily inhibits PBP1A. We present the structure of the SPOR domain of DedD and modeled its binding to glycan chains. Our biochemical data highlight the connection between PG synthases and PG-binding proteins during cell division. Presumably, this connection contributes to stabilizing the inward-growing septal PG layer. The decreased functionality of PBP1B in the *dedD* and *damX* mutants was reverted by the ectopic expression of the respective genes from a plasmid, excluding a polar effect. Our cellular viability data support a semiredundant role for DamX and DedD in enhancing the functionality of PBP1B, and the effect is also seen in wild-type cells. An explanation for these effects might come from our biochemical data, which show that DedD and DamX both have a small but significant stimulatory effect on the GTase and TPase activities of PBP1B.



The previously reported DamX-associated phenotypes are all linked to cell division. A strong overproduction of DamX leads to cell filamentation and death (37). The additional deletion of chromosomal *damX* in the background of a *dedD* mutant causes severe filamentation (30), which can be reversed by mild overproduction of DamX (31). Our results show that mild overproduction of DamX improves the viability of cefsulodin-challenged cells with the exception of *dedD* cells, in which the mild overproduction of DamX was toxic. However, DedD overproduction improved the viability of all strains in the presence of cefsulodin and was not toxic in *damX* cells. These results suggest that an optimal ratio of DedD to DamX is important to maintain cell viability and that DedD is capable of “neutralizing” the toxicity of increased DamX levels. Presumably, DamX and DedD have semiredundant roles in the stimulation of

class A PBPs despite having otherwise different, but complementary, roles during cell division. Both proteins interact with FtsQ in a bacterial two-hybrid assay (30, 31), and the absence of DamX improves the viability of *ftsQ*(*ts*) cells under nonpermissive conditions, suggesting that DamX antagonizes FtsQ function (31). Perhaps DedD protects FtsQ from being antagonized by DamX at the division site, explaining why a mild increase of DamX is toxic only when DedD is absent. In our activity assays, DedD slightly stimulated not only PBP1B but also the GTase of PBP1A, which might explain the more severe cell division defects in the absence of DedD than in the absence of DamX. Because the absence of DedD is better tolerated in cells lacking PBP1A than PBP1B (38) and the simultaneous lack of PBP1A and PBP1B is lethal (43), we hypothesize that DedD is more specific for the function of PBP1A and DamX is more specific for that of PBP1B.

All SPOR proteins localize at the cell division site in *E. coli*, but the timing seems to be different for each of them. In case of FtsN, a small fraction of the total cellular protein amount is recruited to the division site by an interaction with FtsA before septum synthesis begins (35). FtsN-FtsA connect the cytosolic FtsZ ring with PBP1A and PBP1B to direct preseptal PG synthesis (12). Despite their similar structures (Fig. 2), their SPOR domains also show different localization patterns. Unlike the SPOR domains of FtsN and RlpA, those of DamX and DedD are able to form ring-like structures in the absence of constriction (30).

The localization of DedD at the division site and its functionality are significantly diminished but not abolished in the absence of its SPOR domain, which renders the N-terminal transmembrane and adjacent residues essential (38). Since mutations in the transmembrane region abolish the recruitment of a SPOR less DedD to the division site (38), it is tempting to speculate that the interaction of DedD with the class A PBPs takes place through the transmembrane regions of interacting proteins and that such interaction contributes to the recruitment of DedD to the division site and to the regulation of septation.

DamX contains a large and likely folded cytoplasmic domain, together with the largest periplasmic linker region of all the inner membrane SPOR proteins. DamX localizes at the division sites in an FtsZ-dependent and FtsA-, FtsQ-, PBP3-, or FtsN-independent manner (31). The spatial and temporal pattern of DamX localization, together with its positive effect on PBP1B, is consistent with a role during the synthesis of preseptal PG. The SPOR domain is needed to efficiently target DamX to the division site and to cause cell division inhibition when DamX is overproduced (40). Together, these results suggest that DedD and DamX might recognize and bind to specific structures in PG present at the division site before the septum synthesis starts, which could be either denuded glycan strands (28) or perhaps the 1,6-anhydro ends of glycan strands (33, 36). Later, during septation, SPOR proteins provide a connection between PG synthases and the inward-growing septal PG, which may function to stabilize the constricting cell envelope and/or regulate PG synthesis. It remains to be seen in future work how the processive synthesis of septal PG is regulated by interactions with PG-binding proteins.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids, and growth conditions. *E. coli* strains and plasmids used are listed in Table S2.

Primers and methods used to construct the strains and plasmids are detailed in Text S1.

Unless stated otherwise, *E. coli* cells were grown in Miller Luria-Bertani (LB) medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) for protein production. When appropriate, antibiotics were added to the medium (20 mg ml⁻¹ chloramphenicol, 50 mg ml⁻¹ kanamycin, 100 mg ml⁻¹ ampicillin).

Protein purification. The following proteins were purified following published protocols: RlpA (20), PBP1B (19), and FtsN-His (45).

(i) RlpA. LOBSTR (low-background strain) *E. coli* cells containing plasmid pPZW25 were grown in 2 liters of LB medium supplemented with kanamycin at 37°C to an optical density at 578 nm (OD₅₇₈) of 0.4 to 0.5. Protein overproduction was induced by addition of 0.5 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) to the cell culture, which was further incubated for 4 h at 37°C. Cells were harvested by centrifugation (6,200 g, 15 min, 4°C), and the pellet was resuspended in buffer I (25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl [pH 7.5]). After addition of 200 μM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), a 1-in-1,000 dilution of protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and DNase, the cells were disrupted by sonication (Branson Digital). The cell lysate was centrifuged (130,000 g, 60 min, 4°C), and the supernatant was incubated overnight with 4 ml of nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) Superflow (Qiagen), which had been pre-equilibrated in buffer I containing 20 mM imidazole, at 4°C with gentle stirring. The resin was poured into a gravity column and washed with 25 volumes of wash buffer (25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM imidazole [pH 7.5]). Bound protein was eluted with elution buffer (25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 400 mM imidazole [pH 7.5]). The Ni-NTA-eluted protein was dialyzed against 1 liter of dialysis buffer I (25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ [pH 7.5]) for 30 min; 500 ml of dialysis buffer I was replaced with 500 ml dialysis buffer II (25 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ [pH 7.5]) and further dialyzed for 30 min. Restriction-grade thrombin (4 U ml⁻¹; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) was added to remove the oligohistidine tag during overnight dialysis against 1 liter of dialysis buffer II at 4°C. The sample was diluted 1:1 with buffer no salt (25 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂ [pH 7.5]) and applied in AKTA A buffer (25 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl [pH 7.5]) to a 5-ml HiTrap Q HP column using an ÄKTA Prime system (GE Healthcare Bio-Sciences) for anion-exchange chromatography (flow rate, 1 ml min⁻¹). Although a gradient from 150 mM to 1 M NaCl was applied, the protein was present in the flowthrough and wash. The protein was dialyzed against 3 liters of storage buffer (25 mM HEPES-NaOH, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10% glycerol [pH 7.5]) and stored at 80°C.

(ii) His-DamX. LOBSTR cells containing plasmid pPZW23 were grown in 2 liters of LB medium supplemented with kanamycin at 37°C to an OD₅₇₈ of 0.4 to 0.5. Protein overproduction was induced by addition of 0.5 mM IPTG to the cell culture, which was further incubated for 4 h at 37°C. Cells were harvested by centrifugation (6,200 g, 15 min, 4°C), and the pellet was resuspended in buffer I (25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl [pH 7.5]). After addition of 200 μM PMSF, a 1-in-1,000 dilution of protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and DNase, the cells were disrupted by sonication (Branson Digital), and the cell lysate was centrifuged (130,000 g, 60 min, 4°C). The supernatant was discarded, and the membrane pellet was resuspended in extraction buffer (25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 2% Triton X-100 reduced, 10 mM MgCl₂, 10% glycerol [pH 7.5]) and incubated overnight with mixing at 4°C. Resuspended sample was centrifuged (130,000 g, 60 min, 4°C), and the supernatant was incubated with Ni-NTA Superflow (Qiagen) as described for RlpA. The protein did not bind to the resin and was collected from the flowthrough. The flowthrough containing the protein was dialyzed against 3 liters of dialysis buffer I (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ [pH 7.5]) overnight. The sample was applied in AKTA A buffer (25 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0.2% Triton X-100 reduced [pH 7.5]) to a 5-ml HiTrap Q HP column using an ÄKTA Prime system (GE Healthcare Bio-Sciences), and the protein was collected in the flowthrough. The protein was dialyzed against 3 liters of dialysis buffer II (10 mM sodium acetate, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ [pH 4.8]) overnight. The sample was applied in dialysis buffer II containing 0.2% Triton X-100 reduced to a 5-ml HiTrap SP HP column using an ÄKTA Prime system (GE Healthcare Bio-Sciences) for cation-exchange chromatography (flow rate, 1 ml min⁻¹). The protein was eluted using a gradient from 150 mM to 2 M NaCl. Protein-containing fractions were dialyzed against 3 liters of storage buffer (25 mM HEPES NaOH, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 10% glycerol [pH 7.5]) and stored at 80°C.

(iii) DamX-His and sDamX-His. LOBSTR cells containing plasmid pPZW26 and pPZW27 were grown in 2 liters of LB medium supplemented with kanamycin at 37°C to an OD₅₇₈ of 0.4 to 0.5. Protein overproduction was induced by addition of 0.5 mM IPTG to the cell culture which was further incubated for 4 h at 37°C. Cells were harvested by centrifugation (6,200 g, 15 min, 4°C), and the pellet was resuspended in buffer I (25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl [pH 7.5]). After addition of 200 μM PMSF, a 1-in-1,000 dilution of protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), and DNase, the cells were disrupted by sonication (Branson Digital), and the cell lysate was centrifuged (130,000 g, 60 min, 4°C). For DamX-His, the supernatant was discarded, and the membrane pellet was resuspended in extraction buffer (25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 2% Triton X-100 reduced, 10 mM MgCl₂, 10% glycerol [pH 7.5]) and incubated overnight with mixing at 4°C. Resuspended sample was centrifuged (130,000 g, 60 min, 4°C), and the supernatant was incubated with Ni-NTA Superflow (Qiagen), washed, and eluted as described for RlpA using buffers containing 0.2% Triton X-100 reduced. The eluted protein was dialyzed against 3 liters of storage buffer (25 mM HEPES NaOH, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 10% glycerol [pH 7.5]) and stored at 80°C. sDamX-His was purified from the

supernatant of the cell lysate centrifugation using the protocol for DamX-His but omitting detergent in buffers. The eluted protein was dialyzed against 3 liters of dialysis buffer I (25 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ [pH 7.5]) for 1.5 h and against 3 liters of dialysis buffer II (10 mM sodium acetate, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ [pH 4.8]) overnight. The sample was diluted 1:1 with buffer no salt (10 mM sodium acetate, 10 mM MgCl₂ [pH 4.8]) and applied in AKTA A buffer (10 mM sodium acetate, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ [pH 4.8]) to a 5-ml HiTrap SP HP column using an ÄKTA Prime system (GE Healthcare Bio-Sciences) for cation-exchange chromatography (flow rate, 1 ml min⁻¹). The protein was eluted in a gradient from 100 mM to 2 M NaCl. Protein-containing fractions were dialyzed against storage buffer (25 mM HEPES NaOH, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10% glycerol [pH 7.5]) and stored at 80°C.

(iv) DedD. LOBSTR cells containing plasmid pPZW24 were grown in 2 liters of LB medium supplemented with kanamycin at 37°C to an OD₅₇₈ of 0.4 to 0.5. Protein overproduction was induced by addition of 0.5 mM IPTG to the cell culture, which was further incubated for 4 h at 37°C. Cells were harvested by centrifugation (6,200 g, 15 min, 4°C) and the pellet was resuspended in buffer I (25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl [pH 7.5]). After addition of 200 mM PMSF, a 1-in-1,000 dilution of protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and DNase, the cells were disrupted by sonication (Branson Digital), and the cell lysate was centrifuged (130,000 g, 60 min, 4°C). The supernatant was discarded, and the membrane pellet was resuspended in extraction buffer (25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 2% Triton X-100 reduced, 10 mM MgCl₂, 10% glycerol [pH 7.5]) and incubated overnight with mixing at 4°C. Resuspended sample was centrifuged (130,000 g, 60 min, 4°C), and the supernatant was incubated with Ni-NTA Superflow (Qiagen), washed, and eluted as described for RlpA using buffers containing 0.2% Triton X-100 reduced. Restriction-grade thrombin (4 U ml⁻¹; Merck Millipore) was added to the Ni-NTA-eluted protein to remove the oligohistidine tag during dialysis against 3 liters of dialysis buffer I (25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 10 mM MgCl₂ [pH 7.5]) for 20 h at 4°C. Sample was dialyzed against 3 liters of dialysis buffer II (10 mM sodium acetate, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ [pH 4.8]) for 4 h at 4°C and 3 liters of dialysis buffer III (10 mM sodium acetate, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ [pH 4.8]) for 18 h at 4°C. The sample was diluted 1:1 with no-salt buffer (10 mM sodium acetate, 10 mM MgCl₂, 0.2% Triton X-100 reduced [pH 4.8]) and applied in AKTA A buffer (10 mM sodium acetate, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.2% Triton X-100 reduced [pH 4.8]) to a 5-ml HiTrap SP HP column using an ÄKTA Prime system (GE Healthcare Bio-Sciences) for cation-exchange chromatography (flow rate, 1 ml min⁻¹). The protein eluted in a gradient from 150 mM to 2 M NaCl. Protein-containing fractions were dialyzed against storage buffer (25 mM HEPES NaOH, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10% glycerol [pH 7.5]) and stored at 80°C.

Protein coexpression, copurification, and Bocillin FL labeling. C43(DE3) cells transformed with pETDuet plasmids (Table S2) were grown in 500 ml Miller Luria-Bertani (LB) supplemented with ampicillin

(100 mg ml⁻¹) at 37°C to an *A*₆₀₀ of 0.8. Protein expression was induced for 3.5 h by addition of 0.5 mM IPTG. Cells were collected by centrifugation at 4,000 g for 20 min at 15°C and resuspended in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, and EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche). The cells were lysed by three passages through a cell homogenizer (Emulsiflex C3; Avestin). After centrifugation at 4,000 g for 20 min at 4°C, the supernatant was recovered and spun down at 150,000 g for 1 h at 4°C. The pelleted membranes were solubilized in 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 10% (vol/vol) glycerol, 40 mM DDM (Inalco) and 1 tablet of complete EDTA-free protease inhibitors (Sigma) per 50 ml of buffer. The mixture was incubated for 1 h at room temperature under gentle agitation followed by centrifugation at 150,000 g for 1 h at 4°C. The supernatant containing the solubilized membrane proteins was loaded onto a HisTrap column (GE HealthCare) conditioned in buffer B (25 mM Tris-HCl [pH 7.5], 500 mM NaCl, 4 mM DDM). After a wash with buffer B supplemented with 80 mM imidazole, the proteins were eluted in 0.5- to 1-ml fractions using a linear gradient of imidazole from 80 to 500 mM. A 15-ml portion of each fraction was incubated with 2 mM Bocillin FL for 30 min at 37°C. The fractions were analyzed by SDS-PAGE, followed by fluorescence imaging and Coomassie blue staining.

Protein expression for NMR. For labeled DedD (residues 28 to 220) purification, pYS001 was transformed into BL21(DE3). This strain was cultured in 1 liter of M9 containing 1 g/liter of ammonium chloride and 2 g/liter of glucose at 37°C to an *A*₆₀₀ of 0.6, at which point 1 mM IPTG was added to induce protein overproduction overnight at 25°C. Harvested cell pellets were resuspended in lysis buffer (20 mM HEPES [pH 8.0], 300 mM NaCl, 10% glycerol) and lysed by processing twice with a homogenizer (15 kPa; Avestin). Cellular debris was pelleted by centrifugation at 125,000 g for 1 h. The resultant supernatant was loaded onto 10 ml Ni²⁺-saturated Ni-NTA Superflow beads (Qiagen) and washed with 65 mM imidazole in 20 mM HEPES (pH 8.0)–300 mM NaCl, and the protein was eluted with 300 mM imidazole in the previous buffer. Fractions containing pure DedD were pooled and desalting into a buffer of 20 mM HEPES (pH 8.0) and 300 mM NaCl. Protein was frozen rapidly in liquid nitrogen and stored at 80°C until required.

Spot plate assay. Cells were grown overnight at 30°C, the optical density was normalized for each strain assayed in the plate, and the cells were spotted in a 10-fold dilution series on Lenox LB plates (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl), which were incubated overnight at 30°C. Plates were supplemented with 20 mg ml⁻¹ chloramphenicol when strains carrying pKG110-derived plasmids were assayed. When appropriate, 10 mM sodium salicylate (inducer) was added to the plates. Unless stated otherwise, 30 mg ml⁻¹ cefsulodin was used.

Aztreonam susceptibility assay. Overnight cultures of the test strains were grown at 30°C in LB Lennox, reinoculated 1:100, and grown to an OD₅₇₈ of 0.3 to 0.4. A 1-ml portion of each strain was centrifuged for 1 min at 13,000 g and resuspended in 1 ml of 0.9% NaCl. Resuspended cells were diluted to an OD₅₇₈ of 0.125 using 0.9% NaCl. Cells were distributed onto LB Lennox plates using a cotton swab soaked with the cell suspension. Once the plates were dried, an aztreonam MIC test strip (Liofilchem) was applied to each plate, and all the plates were incubated overnight at 30°C.

PG synthesis assays. [¹⁴C]GlcNAc-labeled lipid II (46), dapsylated lipid II (47), and ATTO 550 lipid II (45, 48) were prepared as previously published. Continuous fluorescence GTase assays was performed as described elsewhere (49), using 0.5 mM PBP1A or PBP1B and a 2 mM concentration of the SPOR domain proteins, in a buffer with a final concentration of 50 mM HEPES NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 25 mM MgCl₂ and 0.05% Triton X-100. Briefly, dapsylated lipid II was added to start the reactions, and the decrease in fluorescence at 30°C was measured over time using a plate reader (excitation wavelength of 330 nm; emission wavelength of 520 nm). An endpoint GTase-TPase activity assay was performed as described elsewhere (50) using either 0.75 mM PBP1A and 1.8 mM SPOR domain proteins or 0.5 mM PBP1B and 2 mM SPOR domain proteins and a final concentration of 10 mM HEPES NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ and 0.05% Triton X-100 in the reaction buffer. Briefly, 1.2 nmol (11,000 dpm) of [¹⁴C]GlcNAc-labeled lipid II was dried in a glass vial using a vacuum concentrator and resuspended in 5 ml of 0.2% Triton X-100. To start the reactions, the assayed proteins were added to the resuspended lipidII and further incubated for 60 min at 37°C with shaking (800 rpm). Reactions were stopped by boiling for 5 min, and further cellosyl digestion, reduction, and analysis by HPLC were performed as described in reference 50. The following protein concentrations were used in the assays with low concentrations of PBP1A or PBP1B (0.075 mM PBP1A and 0.038 mM PBP1B) and 0.75 mM SPOR domain proteins. In samples with low PG synthase activity (with abundant unused lipid II), the total radioactivity eluted from the HPLC column (C₁₈) differs between samples due to differences in peak 1, the phosphorylated disaccharide pentapeptide. Peak 1 is generated by acid hydrolysis of unused lipid II (or glycan strands ends carrying the C55-PP moiety) after the GTase-TPase reaction, because lipid II (without hydrolysis) does not elute from the C₁₈ HPLC column used to separate the muropeptides. In samples with abundant unused lipid II, peak 1 varies due to differences in the efficiency of the acid hydrolysis of lipid II between samples. This effect does not impair the quantification of other peaks (PG products). Tris-Tricine SDS-PAGE was used to separate glycan strands (51), using the same protein concentrations and reaction conditions as the TPase activity experiment at low PBP1A and PBP1B concentrations but in the presence of 1 mM ampicillin to inhibit the TPase activity.

NMR spectroscopy. NMR data were collected in 20 mM HEPES, 300 mM NaCl, 10% D₂O (pH 7.0), at

298 K on 1.08 mM ¹³C, ¹⁵N-labeled DedD sample prepared in a 3-mm-diameter NMR tube. All NMR spectra for backbone, side chains, and NOE assignments were recorded on Bruker spectrometers operating at 700, 850, and 950 MHz ¹H NMR frequencies and equipped with ¹H, ¹³C, ¹⁵N-labeled cryoprobes.

Resonance assignments of the backbone was performed using two-dimensional (2D) ¹H, ¹⁵N-BEST-TROSY (BT), 3D BT-HNCANH, 3D BT-HNCO, 3D BT-HNCACO, 3D BT-HNCACB and 3D BT-HN(CO)CACB spectra. Manual side chain assignment was then achieved with conventional 2D ¹H, ¹³C-HSQC (gradient heteronuclear single quantum coherence), 3D (H)C(CCO)NH, 3D H(CCCO)NH, and 3D ¹⁵N-NOESY-HSQC, as well as 3D aliphatic and aromatic ¹³C-NOESY-HSQC experiments. Spectra were analyzed with CcpNmr Analysis 2.4.1.

For structural restraints, dihedral angles (phi and psi) were predicted from backbone chemical shift with the neural network program TALOS , and distance constraints were determined after manual peak-picking and automatic assignment of the 3D NOESY-HSQC experiments reported above by Unio=10 version 2.0.2. Structures were subsequently calculated from these restraints by Aria 2.3.1, with 80 structures from runs 0 to 5, 200 for runs 6 and 7, and 600 for the last run. The 20 lowest-energy structures were further refined in water. Ramachandran analysis showed 86.1%, 13.9%, 0.0%, and 0.0% of the residues of DedD in most favored, additional allowed, generously allowed, and disallowed regions, respectively.

¹H-¹⁵N NOE relaxation data were collected at 25°C on Bruker spectrometers operating at 700 MHz and equipped with ¹H, ¹³C, ¹⁵N-labeled cryoprobes. ¹H-¹⁵N NOE values were determined by the comparison of the intensities of each amide resonance with and without a 3-s saturation period and using the BEST-HETNOE sequence (52). Standard deviations were calculated from errors on peak intensities.

Data availability. The 20 lowest-energy structures were deposited in the PDB with accession number **6ZTG**. All other data supporting the findings of this study are included in the main text and supplemental material.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the MRC (MR/N002679/1), Wellcome Trust (101824/Z/13/Z), “Fonds de la Recherche Scientifique” FRS_FNRS (Brussels, Belgium) grant CDR J.0030.18 and FRIA 1.E.038.17, JPIAMR-CIHR and the Howard Hughes International Senior Scholar program. Financial support from the IR-RMN-THC Fr3050 CNRS for conducting the research is gratefully acknowledged. We also acknowledge infrastructure funding from the Canadian Foundation of Innovation and British Columbia Knowledge Development Fund. M.T. is a research associate of the FRS_FNRS, N.A.C. holds an NSERC PGS D award, and N.C.J.S. is a Tier I Canada Research Chair in Antibiotic Discovery. This work used the platforms of the Grenoble Instruct-ERIC center (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB), supported by FRISBI (ANR-10-INBS-05-02) and GRAL, financed within the University Grenoble Alpes graduate school (Ecole Universitaire de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003).

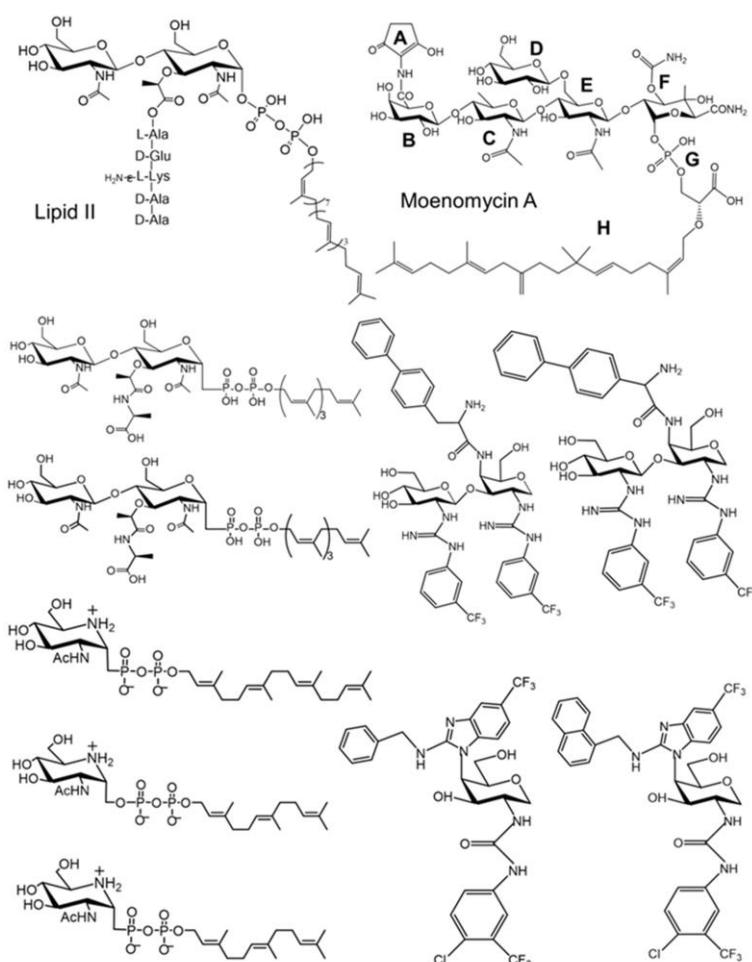
M.P., K.P. and W.V. designed the work. M.P., K.P. and A.B. performed experiments. M.P., K.P., A.B., M.T. and W.V. analyzed the data. Y.S. performed the NMR experiments, C.K., C.L. and J.-P.S. analyzed the NMR data. N.A.C., N.C.J.S., and J.-P.S. designed the structural work. E.B. provided research tools. All authors contributed to writing the manuscript.

We declare no competing interests.

VIII. Annexes

Annexe 1 : Structures du Lipide II, de la moénomycine A et d'inhibiteurs de la famille GT51.

A.

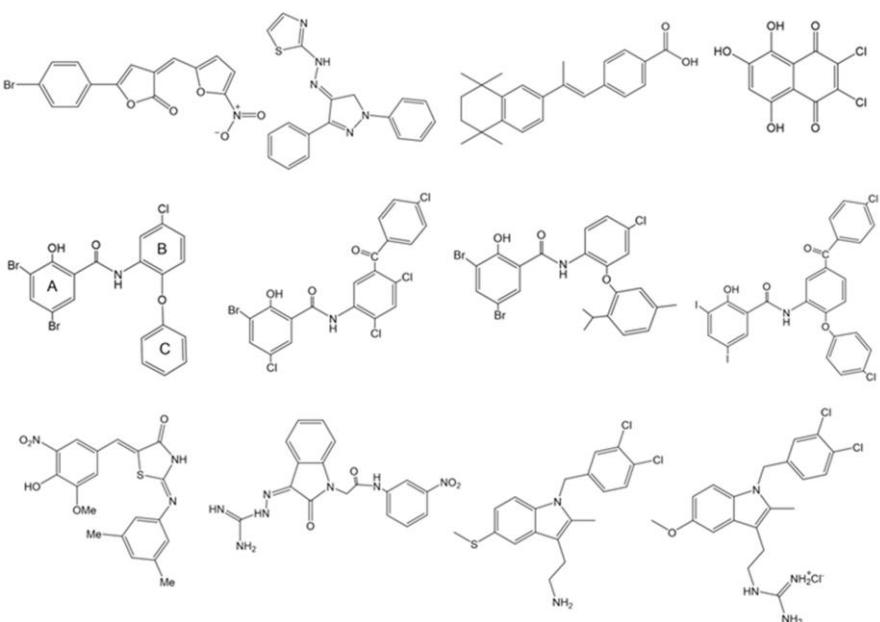


A. Structures du Lipide II, de la moénomycine A et d'analogues de Lipide II.

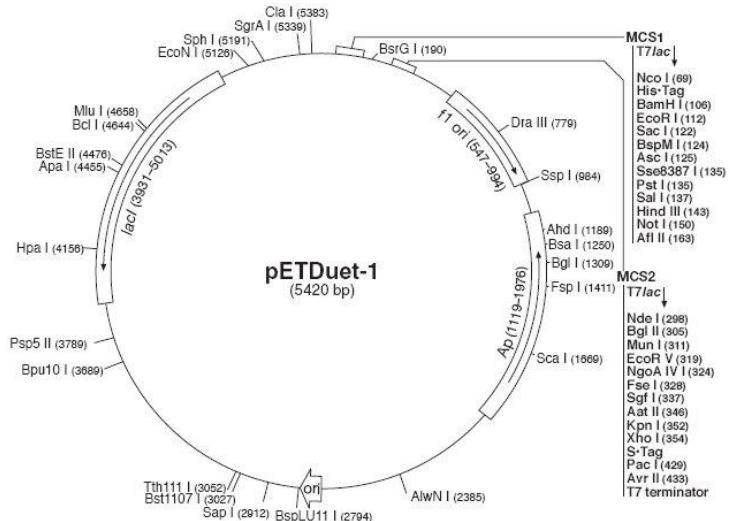
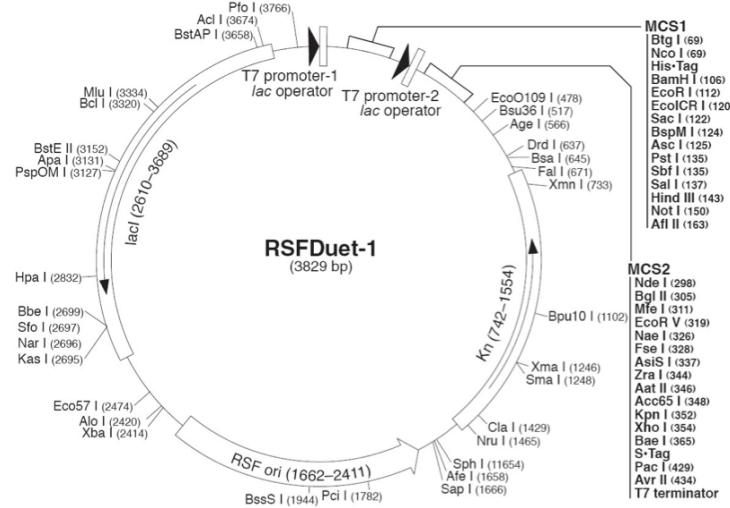
B. Autres molécules inhibitrices de la famille GT51.

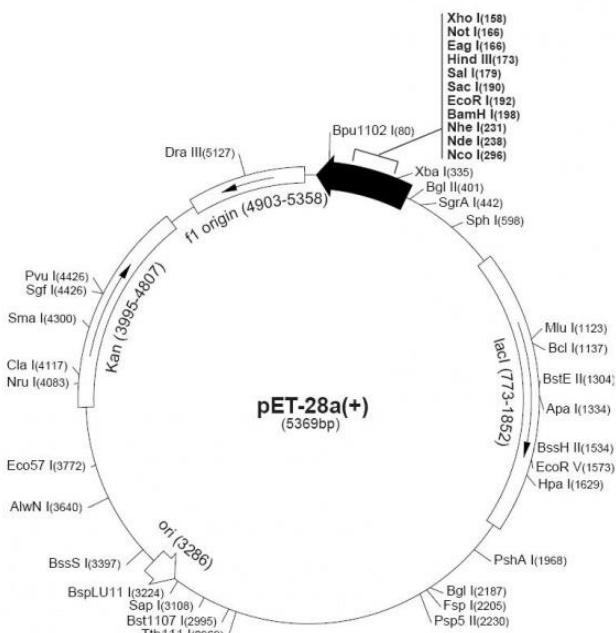
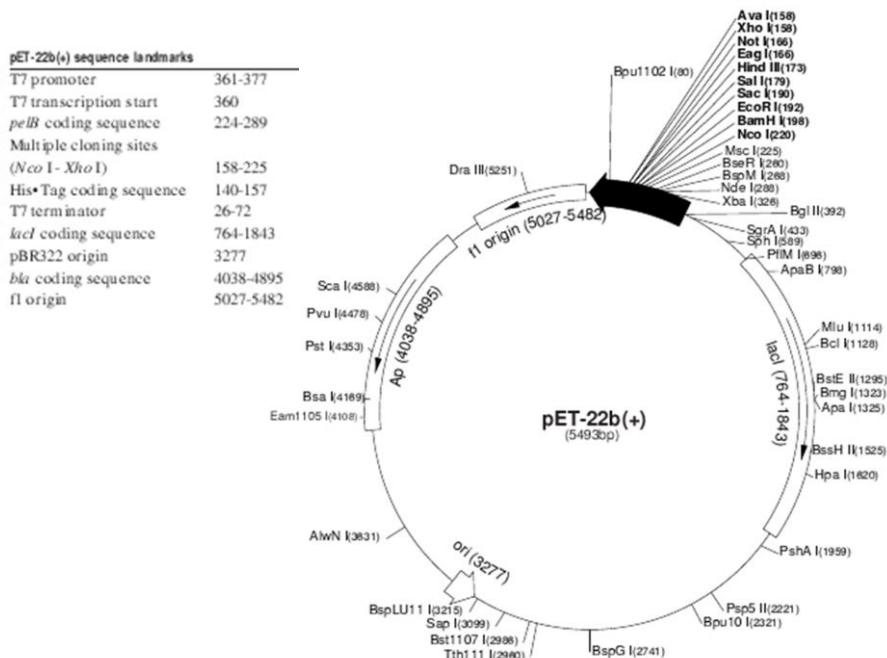
(Sauvage & Terrak, 2016)

B.



Annexe 2 : Cartes des plasmides commerciaux.





Bgl II → **T7 promoter** → **lac operator** → **Xba I** → **rbs**
Nco I → **His-Tag** → **Nde I** → **Nhe I** → **T7-Taq**

AGATCTCGATCCCGCAGAAATTAACTACGACTCACTATAGGGATTGTGAGCGGATAACAATTCCCTCTGAAATAATTGGTTAACCTTAAGAAGGAGA
 TATACCATGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCCTGGTGCCGCCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGCTGGACAGCAA
 MetGlySerSerHisHisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySerHisMetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGln

BamH I → **Eco R I** → **Sac I** → **Sal I** → **Hind III** → **Eag I** → **Xba I** → **thrombin** → **His-Tag**
 ATGGGTGGGATCCGAATTGAGCTCCGTCGACAACTTGCGGCCGACTCGAGCACACCAACCCACCAACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGGCC
 MetGlyArgGlySerGluPheGluLeuArgArgGlnAlaCysGlyArgThrArgAlaProProProLeuArgSerGlyGlyGlnGln

Bpu1102 I → **T7 terminator**

GAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTGGGCCCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTG

Annexe 3 :

Les différentes mutations ont été réalisées avec les paires d'oligonucléotides repris dans le tableau ci-dessous :

Mutations	Paires d'oligonucléotides (5'-3')
FtsB (E56A)	B1E56A : ACTTTTGCCGCGATTGACGATCTC B2E56A : TGATCGTTCGCGCTTAAG
FtsB (E56K)	B1 E56K : ACTTTTGCCAAAATTGACGATCTC B2 E56K : TGATCGTTCGCGCTTAAG
FtsB (D59H)	B1D59H : CGAAATTGACCATCTCAATGGCG B2D59H : GCAAAAAGTTGATCGTTTC
FtsL (D93A)	L1D93A : TGCGCTCGCGCGCATAGCCGGG L2D93A : TTCTCTTCAAGGATCAGGTTGCGC
FtsN (Y85W)	N1Y85W : ACGCTGGCGCGATTAAAGAGCTGG N2Y85W : TCTCTGGTTTGGTAG
FtsN (W83L)	N1W83L : AGAAGAACGCCCTGCGCTACATTAAAG N2W83L : GGTTTGGTAGTCG
PBP1b (T140A)	1B_T140A_F : GTCGAAAATGGCGCGTCTGGCG 1B_T140A_R : ACCTGACGATACTGGGTC
PBP1b (R141A)	1B_R141A_F : GAAAATGACCGCGCTGGCGAATTACC 1B_R141A_R : GACACCTGACGATACTGG
PBP1b (R397A)	1B_R397A_F : GTTGGAGTGGCGCGCTGGGGGG 1B_R397A_R : ATGTCATAGAGTTCTGATCAATAATC
PBP1b (T140A/R141A)	1B_T140A/R141A_F : GTCGAAAATGGCGCGCTGGCGAATTACC 1B_T140A/R141A_R : ACCTGACGATACTGGGTC

Les oligonucléotides mentionnés dans la description de la réalisation des constructions ci-après sont repris dans le tableau ci-dessous.

Oligonucléotides	Sequence (5'-3')
QF	ATGTCGCAAGGCTGCTCTGAACAC
QR	TCATTGTTGTTCTGCCTGTGCCTG
Q2F	TTGAGTCGACAATAATTGTTAACCTTAAGAAGGAGATATACATATGTCGAGGC TGCTCT
Q2R	CAGAGCGGCCGCTCATTGTTGTTCTGCCTGTGCCTG
LF	ATGATCAGCAGAGTGACAGAAGCTC
LR	TTATTTGCACTACGATATTCTTGAC
L2F	TTGAGAATTCAATAATTGTTAACCTTAAGAAGGAGATATACATATGATCAGCAG AGT
L2R	CAGAGTCGACTTATTGCACTACGATATTCTTGAC
BF	ATGGGTAAACTAACGCTGCTGGC
BR	TTATCGATTGTTGCCCGCAGAC
B2F	CAGAAAGCTTACGCTGCTGGCTATTCTG
B2R	CAGAGAATTCTATCGATTGTTGCCCGCAGAC
LmatF	ATGATTAATAATTAAACAGAAGCTAAGCAAAGTTAAAGGATC

LmatR	TTATTTTGCAC TACGATATTTCTTGTGACG
Lmat2F	TTGAGAATTCAATAATTTGTTAACCTTAAGAAGGAGATACATATGATTAATAAATTAAC
BLQStF	CATGGCAAGCTGGAGCCACCCGCAGTCGAAAAGGGTGACTGGTGCCACGCCG
BLQStR	AGCTTACCAGCGGA ACTACCGCGTGGCACCGTGCACCCCTTCGAAC TGC GGG
NF	TATACATATGGCACAACGAGATTATGTACG
NR	CAGACTCGAGTCAACCCCCGGCGGCGAGC
1BF	TATAGACGT CATGCCCGCAAAGGTAAGGGCAAAG
1BR	CAGACTCGAGTTAATTACTACCAAACATATCCTGATCCAAC
B3F	TATAGGATCCGGTAAACTAACGCTGCTGTTGCTGG
Q3F	TATAGAATT CGTCGCAGGCTGCTGAACACG
1B_K58	GATACGCATCTCGAGTTATGACGGCTGCTGCATCTC
1B_S804	GATACGCATCTCGAGTTATGACGGCTGCTGCATCTC
N_M1/pET22	TATACATATGGCACAACGAGATTATG
N_R130/pET22	TATACTCGAGGCATATCAGCCTGC
N_M1/pDuet	TATAGGATCCTGCACAACGAGATTATGTACG
N_R130/pDuet	TATAAAGCTTTAGCGCATATCAGCCTGC
Ncol-Histev-BamHI-for	CATGGGCAGCAGCCATCACCACATCACACCACAGCAGCGGAGAGAAAAC TTGTATTTCCAGGGCAGCCAG
Ncol-Histev-BamHI-rev	GATCCTGGCTGCCCTGGAAATACAAGTTTCTGCGCTGCTGGTGATGATGGT GATGGCTGCTGCC
TSBLQ_F_Ncol	CATGGGCTGGAGCCACCCGCAGTCGAAAAGGGTGGAGGTTCTGGCGGTGGATCG GGAGGTTCA GCTTGAGCCACCCGCAGTCGAAAAGTCCGCTA
TSBLQ_R_HinDIII	AGCTTAGCGGACTTTCAACTGC GGCTCCAAGCTGAACCTCCGATCCACCG CCAGAACCTCCACCCCTTCGAACTGC GGCTGCCAGCC
for-wkp-BamHI	GCCAGGATCCCGCTTCTCTCTCCCACG
rev-wkp-HinDIII	CCGCAAGCTTCATCGCACACCCGTG
for-3kp-BgIII	TGGCAGATCTCAAGCAGCGCCAAAACGCCTAAAAGC
rev-3kp-Xhol	CAGACTCGAGTTACGATCTGCCACCTGTTCCCTCG
for-3kp-BamHI	GCCAGGATCCGAAGCAGCGCCAAAACGCCTAAAGC
rev-3kp-Sall	CCGCGTCGACTTACGATCTGCCACCTGTTCCCTCG
for-wkp-BgIII	TGGCAGATCTCCGTTCTCTCTCCCACG
rev-wkp-Xhol	CAGACTCGAGTCATCGCACACCCCGTG
For-FtsK210-Sall	TTCGAGCTCCGTGACATGAGCCAGGAATACATTGAAGACAAAG
Rev-FtsK210-Xhol	GGTGGTGGTGCTCGAGGGTATCATCGCGACGGGTACGA

pCIP1051a. Le vecteur pCIP1051 permettant l'expression de MurJ avec un His-Tag N-terminal est modifié en ajoutant un site de clivage de ce tag. Pour ce faire, l'insertion d'un « oligo-annealing » des oligonucléotides Ncol-Histev-BamHI-for/Ncol-Histev-BamHI-rev) dans le vecteur pCIP1051 digéré par les enzymes Ncol/BamHI pour donner le pCIP1051a.

pRSF-HisftsBLQ et pRSF-ftsHisBL^{*}Q. Les gènes *ftsB* *ftsL* et *ftsQ* ont été amplifiés par PCR en utilisant respectivement les oligonucléotides BF/BR, LF/LR, et QF/QR. Ces produits PCRs sont ensuite amplifiés respectivement avec les oligonucléotides B2F/B2R, L2F/L2R, et Q2F/Q2R. Après digestions, ces 3 fragments digérés par EcoRI et Sal sont ligués pour donner l'assemblage (HindIII)-*ftsB*-(EcoRI)-*ftsL*-(Sall)-*ftsQ*-(NotI). Ce dernier amplifié avec les oligonucléotides B2F/Q2R puis digéré par HindIII/NotI

puis inséré dans le MCSI du pRSFDuet-1 (Novagen-EMD Millipore) préalablement digéré par ces deux mêmes enzymes. La forme *FtsLBL*^{*}Q (avec les mutations dans *FtsL* S3N, R4K, et V5L) est obtenu par deux PCR consécutives : avec les oligonucléotides LmatF/LmatR et Lmat2F/L2R. Ce fragment PCR est utilisé pour remplacer le *FtsL* sauvage après digestion par EcoRI/Sall. C'est ce plasmide obtenu qui est utilisé majoritairement dans ce travail.

pRSF-His^{*}f_{ts}B_LQ-f_{ts}N. Le gène *ftsN* a été amplifié par PCR, à partir du plasmide pDML2032, avec les oligonucléotides NF et NR. Après digestion du produit PCR et du pRSF-His^{*}f_{ts}B_LQ par NdeI/Xhol, le fragment *ftsN* est cloné dans le MCSII du vecteur.

pRSF-Strep^{*}f_{ts}B_LQ. Ce vecteur est obtenu en enlevant le tag polyhistidine du vecteur pRSF-His^{*}f_{ts}B_LQ par double digestion Ncol et HindIII puis par insertion de l'oligoannealing réalisé avec les oligonucléotides TSblq_F_Ncol/TSblq_R_HindIII formant le Twinstrep-tag.

pRSF-TwinStrep^{*}f_{ts}B_LQ. Ce vecteur est obtenu en enlevant le tag polyhistidine du vecteur pRSF-His^{*}f_{ts}B_LQ par double digestion Ncol et HindIII puis par insertion de l'oligoannealing réalisé avec les oligonucléotides

pRSF-His^{*}f_{ts}B_LQ-f_{ts}W. Le gène *ftsW* est excisé du plasmide pDLM2040 par BglII/Xhol puis inséré dans le MSC2 du pRSF-His^{*}f_{ts}B_LQ préalablement digéré par ces deux mêmes enzymes.

pRSF-His^{*}B_LQ-f_{ts}I. Le gène *ftsI* est excisé du plasmide pDLM2041 par BglII/Xhol puis inséré dans le MSC2 du pRSF-His^{*}f_{ts}B_LQ préalablement digéré par ces deux mêmes enzymes.

pRSF-His^{*}f_{ts}B_LQ-ponB. Le gène *ponB* est amplifié par PCR avec les oligonucléotides 1BF et 1BR puis inséré dans le MCS2 du pRSF-His^{*}f_{ts}B_LQ après digestion du produit PCR et du vecteur par AatII/Xhol.

pRSF-His^{*}f_{ts}B_L. Le gène *ftsB* est amplifié par PCR avec les oligonucléotides B3F et B2R puis inséré dans le MSC1 du plasmide pRSF-Duet entre BamHI et EcoRI. Le gène *ftsL*^{*} a été amplifié à partir du vecteur pRSF-His^{*}f_{ts}B_LQ avec les oligonucléotides Lmat2F et L2R puis inséré entre EcoRI et Sall.

pRSF-His^{*}f_{ts}BQ. Le gène *ftsB* est amplifié par PCR avec les oligonucléotides B3F et B2R puis inséré dans le MSC1 du plasmide pRSF-Duet entre BamHI et EcoRI. Le gène *ftsQ* a été excisé du vecteur *ftsQ* pRSF-His^{*}f_{ts}B_LQ par Sall/NotI puis inséré dans le plasmide précédemment obtenu.

pRSF-His^{*}f_{ts}LQ. Le gène *ftsL*^{*} a été amplifié à partir du vecteur pRSF-His^{*}f_{ts}B_LQ avec les oligonucléotides Lmat2F et L2R puis inséré entre EcoRI et Sall. Le gène *ftsQ* a été excisé du vecteur *ftsQ* pRSF-His^{*}f_{ts}B_LQ par Sall/NotI puis inséré dans le plasmide précédemment obtenu.

pRSF-His^{*}f_{ts}B_L-ponB. Le gène *ponB* est amplifié par PCR avec les oligonucléotides 1BF et 1BR puis inséré dans le MCS2 du pRSF-His^{*}f_{ts}B_LQ après digestion du produit PCR et du vecteur par AatII/Xhol.

pRSF-His^{*}f_{ts}Q-ponB. Le gène *ponB* est amplifié par PCR avec les oligonucléotides 1BF et 1BR puis inséré dans le MCS2 du pRSF-His^{*}f_{ts}Q après digestion du produit PCR et du vecteur par AatII/Xhol.

pRSF-His^{*}f_{ts}Q. Le gène *ftsQ* est amplifié par PCR avec les oligonucléotides Q3F et Q2R 1BR puis inséré dans le MSC1 du pRSF-Duet après digestion du produit PCR et du vecteur par EcoRI/NotI.

pRSF-His^{*}f_{ts}W-f_{ts}N. Le gène *ftsN* est amplifié par PCR avec les oligonucléotides NF et NR à partir du plasmide pDML2032 puis inséré dans le MCS2 du vecteur pRSF entre les sites NdeI et Xhol. Le gène

ftsW, excisé du plasmide pDML2041 par BamHI/HindIII est alors inséré dans le MCS1 entre ces deux sites.

pDuet-HisftsN- ponB. Le gène *ftsN* est amplifié par PCR avec les oligonucléotides N2F et N2R à partir du plasmide pDML2032 puis inséré dans MCS2 du pDUET-1 entre BamHI/HindIII. Le gène *ponB* est amplifié par PCR avec les oligonucléotides 1BF et 1BR puis inséré dans le MCS2 de ce vecteur entre AatII/Xhol.

pRSF-HisftsBL^{*}Q-FtsW_{HA}. Le gène *ftsW* avec l'insertion de l'épitope HA dans la boucle 7/8 (*ftsW_{HA}*) est excisé du plasmide pDML2043 par BglII/Xhol puis inséré dans le MCS2 du plasmide pRSF-HisftsBL^{*}Q entre ces deux mêmes sites.

pET28a-ponB (K58-S804). La forme tronquée du gène *ponB* encodée la PBP1b (K58-S804) est amplifiée par PCR à partir du plasmide pDML924 avec les oligonucléotides 1B_K58/1B_S804. Le produit PCR est digéré par NdeI/Xhol puis inséré dans le plasmide pET-28a entre ces deux mêmes sites.

pET22b-ftsN1-130His. Le gène tronqué *ftsN1-130* (codant les AA de 1 à 130) est amplifié par PCR à partir du plasmide pDML2032 avec les oligonucléotides N_M1/pET22b et N_R130/pET22b puis cloné dans le pET22b entre les sites NdeI/Xhol. Cette construction permet l'expression de la protéine avec un tag polyhistidine C-terminal.

pDuet-HisftsN130- ponB. Le gène tronqué *ftsN1-130* est amplifié par PCR à partir du plasmide pDML2032 avec les oligonucléotides N_M1/pDuet et N_R130/pDuet puis inséré dans le MCS1 du pETDuet-HisftsN- *ponB* entre les sites BamHI et HindIII afin de remplacer la forme complète de *FtsN*.

pDuet-HisftsWkp-fts/kp. Le gène *FtsW* de *Klebsiella pneumoniae* est amplifié par PCR avec les oligonucléotides for-wkp-BamHI et rev-wkp-HinDIII puis cloné dans le pETDuet-1 entre BamHI et HinDIII. Ensuite, *ftsI* est amplifié par PCR avec les oligonucléotides for-3kp-BglII et rev-3kp-Xhol puis cloné dans le vecteur préalablement obtenu entre BglII et Xhol.

pDuet-HisftsI/kp-ftsWkp. Le gène *ftsI* de *Klebsiella pneumoniae* est amplifié par PCR avec les oligonucléotides for-3kp-BamHI et rev-3kp-Sall puis clonée dans le pETDuet-1 entre BamHI et Sall. Ensuite, *FtsW* est amplifié par PCR avec les oligonucléotides for-wkp-BglII et rev-wkp-Xhol puis cloné dans le vecteur préalablement obtenu entre BglII et Xhol.

pRSF-HisQ-ftsW. Le gène *ftsW* est excisé du plasmide pDLM2040 par BglII/Xhol puis inséré dans le MSC2 du pRSF-HisFtsQ préalablement digéré par ces deux mêmes enzymes.

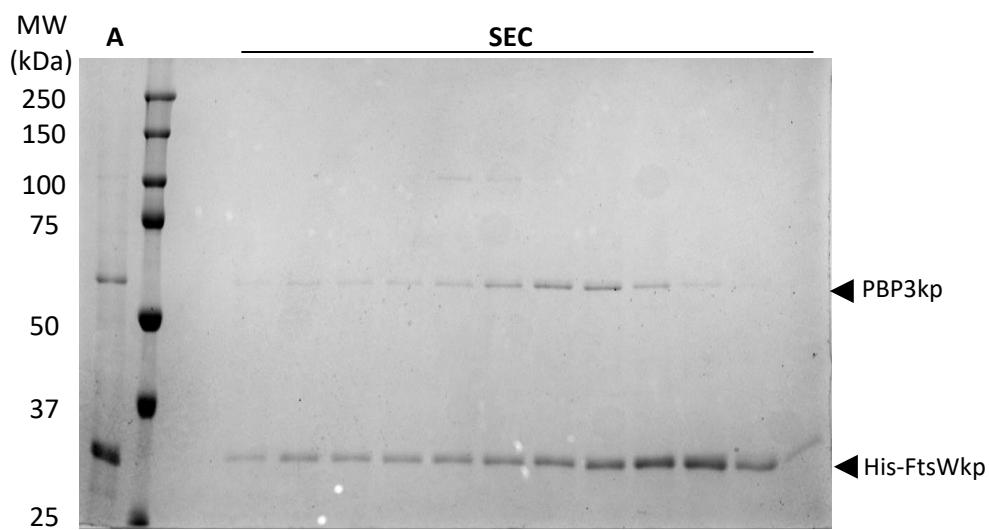
pRSF-HisBL^{*}-ftsW. Le gène *ftsW* est excisé du plasmide pDLM2040 par BglII/Xhol puis inséré dans le MSC2 du pRSF-HisFtsBL^{*} préalablement digéré par ces deux mêmes enzymes.

PDuet-HisftsN-ftsI. Le gène *ftsN* est amplifié par PCR avec les oligonucléotides N2F et N2R à partir du plasmide pDML2032 puis inséré dans MCS2 du pDUET entre BamHI/HindIII. Le gène *ftsI* est excisé du plasmide pDLM2041 par BglII/Xhol puis inséré dans le MSC2 du pRSF-HisFtsBL^{*}Q préalablement digéré par ces deux mêmes enzymes.

Annexe 4 : Données de collection et de raffinement du complexe PBP1b-^EFtsN.

PBP1b-^EFtsN	
Data Collection :	
Space group	<i>P2₁2₁2</i>
a, b, c (Å)	63.1, 283.0, 62.7
α, β, γ (°)	90, 90, 90
Resolution range (Å) ^a	47.2 – 2.4 (2.51 – 2.4)
<I>/<σI> ^a	8.1 (1.5)
Completeness elliptical (%) ^a	95.5 (85.9)
Completeness spherical (%) ^a	57.1 (22.3)
Redundancy ^a	8.5 (7.2)
Refinement:	
Resolution range (Å)	47.2 – 2.4
No. of unique reflections	25830
R work (%)	22.5
R free (%)	25.6
No. atoms	
Protein	5525
Ligands	77
Water	55
RMS deviations from ideal stereochemistry	
Bond lengths (Å)	0.01
Bond angles (°)	1.5
Mean B factor (Å ²)	
Protein	78.2
Ligands	150
Water	36.1
Ramachandran plot:	
Favoured region (%)	94.2
Allowed regions (%)	5.4
Outlier regions (%)	0.4

Annexe 5 :

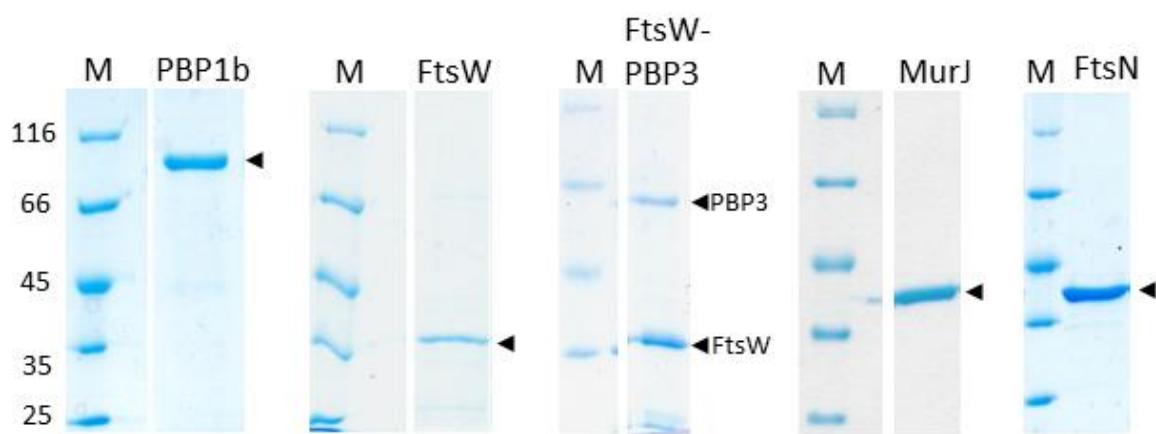


Gel SDS-PAGE de la purification du complexe FtsW-PBP3 de *Klebsiella pneumoniae*.

A : Complexe FtsW-PBP3 après une étape de purification sur colonne au nickel.

SEC : Profil en sortie de colonne Superdex 200 increase 10/300 GL increase de l'échantillon A.

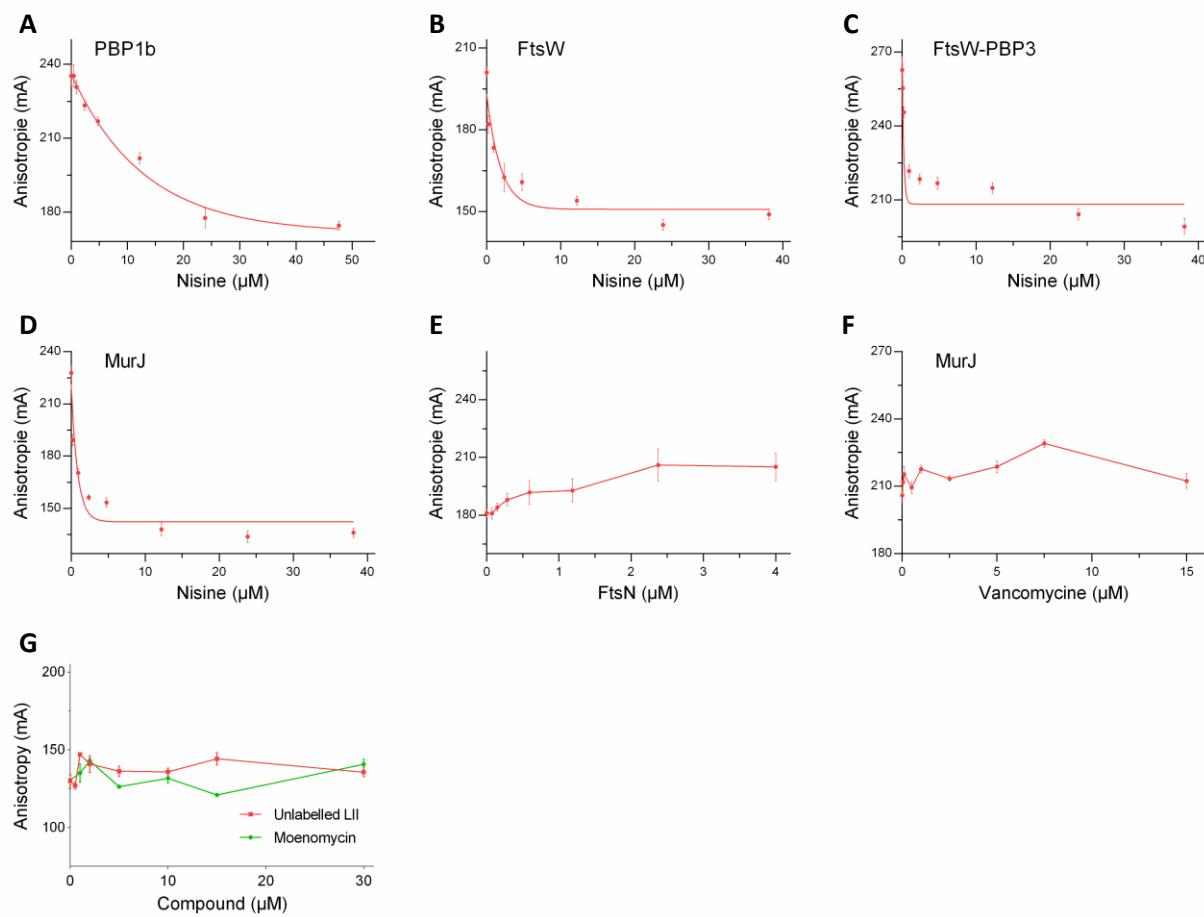
Annexe 6 :



Gel SDS-PAGE des purifications du complexe FtsW-PBP3 et des protéines FtsW, MurJ, PBP1b et FtsN.

M : Marqueur de poids moléculaire de 25 à 116 kDa.

Annexe 7 :



(A), (B), (C) et (D) : Titrage des complexes protéines (PBP1b, FtsW, FtsW-PBP3 et MurJ) – LII-NBD par la nisine.

(E) : Titrage du LII-NBD par FtsN.

(F) : Titrage du complexe MurJ-LII-NBD par la vancomycine.

(G) : Titrage du LII-NBD par la moénomycine et le Lipide II.