



**HAL**  
open science

# Rôles coopératifs du peptidoglycane et des acides téichoïques dans le remodelage de la paroi et la division cellulaire de *Streptococcus pneumoniae*

Julie Bonnet

► **To cite this version:**

Julie Bonnet. Rôles coopératifs du peptidoglycane et des acides téichoïques dans le remodelage de la paroi et la division cellulaire de *Streptococcus pneumoniae*. Sciences agricoles. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV034 . tel-02008878

**HAL Id: tel-02008878**

**<https://theses.hal.science/tel-02008878>**

Submitted on 6 Feb 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Virologie - Microbiologie - Immunologie**

Arrêté ministériel : 25 Mai 2016

Présentée par

**Julie BONNET**

Thèse dirigée par **Anne Marie DI GUILMI**

préparée au sein du **Groupe Pneumocoque à l'Institut de Biologie Structurale**

dans l' **Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

### **Rôles coopératifs du peptidoglycane et des acides téichoïques dans le remodelage de la paroi et la division cellulaire de *Streptococcus pneumoniae***

Cooperative roles of peptidoglycan and teichoic acids in the cell wall remodeling and division of *Streptococcus pneumoniae*

Thèse soutenue publiquement le **5 octobre 2017**,  
devant le jury composé de :

**Dr. Marie-Pierre CHAPOT-CHARTIER**

Directrice de recherche, INRA Centre Jouy-en-Josas, Rapporteur

**Dr. Michel ARTHUR**

Directeur de recherche, INSERM Délégation Ile-de-France, Rapporteur

**Dr. Nathalie CAMPO**

Chargée de recherche, CNRS délégation Midi-Pyrénées, Examinatrice

**Pr. Max Maurin**

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, CHU Grenoble Alpes,  
Examineur, Président du jury

**Dr. Anne Marie DI GUILMI**

Chargée de recherche, CEA de Fontenay-aux-Roses, Directrice de thèse





# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury : les rapporteurs Dr. Marie-Pierre Chapot-Chartier et Dr. Michel Arthur et les examinateurs Dr. Nathalie Campo et le Pr. Max Maurin président du jury, d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Merci à Nathalie Campo et Sylvie Elsen pour leur implication et les nombreux conseils au cours des comités de suivi de thèse.

Je remercie l'Ecole Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant et le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche pour le financement de mon doctorat.

Merci à Thierry Vernet, directeur du groupe pneumocoque de m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je remercie de tout coeur ma directrice de thèse Anne Marie Di Guilmi, merci de m'avoir fait confiance, de la qualité de ton encadrement, tout ton travail, ta patience, tes conseils et ton soutien, rien de tout cela n'aurait été possible sans toi ! Merci ♡

Un grand merci à Claire Durmort pour ton investissement dans nos projets, la qualité de ton travail, tes conseils et ta disponibilité malgré un emploi du temps bien chargé, ce fût un très grand plaisir de travailler à tes côtés.

Merci à tous les membres du groupe pneumocoque présents à nouveau Anne Marie et Thierry, Cécile Morlot, André Zapun, Laure Bellard, Anne Marie Villard, Philippe Calvez, Christopher Arthaud et les nombreuses techniciennes et stagiaires avec qui nous avons partagé un bout de chemin. Merci pour vos conseils, votre soutien, la bonne ambiance du labo, toutes nos discussions riches et variées qui m'ont beaucoup apportées, les gâteaux et autres festivités.

Merci à Laure pour ton amitié, ton soutien, toutes les discussions sans tabous, nos délires et moments potins.

Merci aux anciens doctorants et post-docs du labo Max, Jimmy, Jules, Rémi, Xavier pour leurs conseils avisés et tous les bons moments passés ensemble au labo et plus.

Des mercis tout spéciaux à Maxime pour ton amitié, ton soutien, nos interminables discussions, les découvertes musicales, tes conseils, et à Charlène et Ambre,

merci pour votre amitié, votre soutien et bien plus encore. Merci à vous trois pour tous les moments passés ensemble et les soirées bien arrosées!

Je tiens aussi à remercier tous nos collaborateurs des plateformes de l'ISBG (avec le support de FRISBI et GRAL au sein du PSB). Un grand merci à Christine Moriscot et Benoît Gallet de la plateforme de microscopie électronique, dirigée par Guy Schoen, pour les superbes images et les nombreuses heures de travail. Benoît, j'espère avoir contribué à ta collection artistique de pneumo! Merci à Jean Philippe Kleman pour avoir sauvé mon projet grâce à la plateforme de microscopie, ta patience à toute épreuve, ta précieuse aide et ta disponibilité.

Merci beaucoup à Nathalie Campo, pour ton investissement, ton aide, tes conseils et ton expertise en microscopie et analyse d'image. Un grand merci à Isabelle Mortier pour ton travail, ta bonne humeur, ta patience, ta gentillesse et ta persévérance qui ont permis d'obtenir de super images de microscopie! Et merci à l'ensemble de l'équipe Transformation du pneumocoque du Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires à Toulouse dirigée par Patrice Polard pour leur accueil.

Merci à Yung-Sing Wong pour tout ton travail et les nombreuses molécules de Click qui ont amené à de superbes résultats! Merci à Yves Brun pour les D-Ala fluorescents et la bonne humeur que tu as amené au labo pendant 6 mois, ainsi qu'à Nicolas Gisch pour son aide et les analyses d'acides teichoïques et de peptidoglycane.

Ces derniers remerciements reviennent à Pauline et Quentin, Max et Sabine, Cha et Guillaume, Ambre, Amandine et David, merci pour votre amitié, votre soutien et tous ses moments de bonheur partagés, et enfin un Merci infini à Steven, ma famille et belle-famille, merci pour votre présence, votre amour et bien plus encore.

# Contribution aux travaux

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont le fruit de mon travail de thèse au sein du groupe Pneumocoque à l'Institut de Biologie Structurale.

Dans les publications présentées chapitre 5 page 93 et 8 page 157, j'ai construit toutes les nouvelles souches sauf les souches *FtsZ-mKate* et  $\Delta$ *pgdA* et la protéine LytAE87Q produites par Maxime Jacq. J'ai réalisé l'ensemble des expériences dont certaines en collaboration avec les plateformes de l'IBS (Microscopie électronique avec Benoît Gallet et Christine Moriscot, et Microscopie à épifluorescence avec Jean-Philippe Kleman), et une partie de la microscopie en timelapse a été réalisée à Toulouse au LMGM avec Isabelle Mortier et Nathalie Campo. Les acides aminés fluorescents pour le marquage du peptidoglycane ont été synthétisés par Michael S. VanNieuwenhze. Les molécules de marquage des acides téichoïques ont été synthétisées et mises au point par Yung-Sing Wong et Anne Marie Di Guilmi.

Dans la publication sur la chimie click présentée chapitre 6 page 125, j'ai participé au test de culture du pneumocoque en présence des molécules de choline modifiées, aux expériences de microscopie de *Streptococcus pneumoniae* et réalisé toutes les expériences de marquage en co-culture.

Dans la publication en annexe page 203, j'ai construit les souches contenant les protéines fusionnées à Jo ou In, et réalisé le développement des expériences d'immunoblots et de localisation par microscopie à fluorescence.



# Table des matières

<b>Remerciements</b>	<b>5</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>9</b>
<b>I Introduction</b>	<b>13</b>
<b>1 <i>Streptococcus pneumoniae</i></b>	<b>15</b>
1.1 Classification phylogénétique . . . . .	16
1.2 Physiopathologie et prévalence . . . . .	16
1.3 Prophylaxie et traitements . . . . .	18
1.3.1 Les vaccins ciblant la capsule polysaccharidique . . . . .	18
1.3.1.1 Synthèse et composition de la capsule . . . . .	18
1.3.1.2 Vaccins . . . . .	19
1.3.2 Antibiotiques et résistances . . . . .	20
1.3.3 Stratégies alternatives en développement . . . . .	21
<b>2 La paroi</b>	<b>23</b>
2.1 Acides teichoïques . . . . .	25
2.1.1 Présentation générale . . . . .	25
2.1.2 Biosynthèse et structure des acides téichoïques chez <i>Streptococcus pneumoniae</i> . . . . .	27
2.1.2.1 Localisation de la biosynthèse des TA . . . . .	31
2.1.3 Rôle de la choline . . . . .	35
2.1.4 Choline binding proteins . . . . .	36
2.1.4.1 LytA et l'autolyse en phase stationnaire . . . . .	36
2.1.4.2 Rôle de LytA, CbpD et LytC (et CbpF) dans la lyse fratricide induite par les cellules compétentes au cours de la transformation bactérienne . . . . .	43



2.1.4.3	Les autres CBPs . . . . .	46
2.2	Peptidoglycane . . . . .	49
2.2.1	Rôle . . . . .	49
2.2.2	Composition - Synthèse . . . . .	49
2.2.3	Mode d'action des $\beta$ -lactamines et résistance . . . . .	54
2.2.4	Maturation et remodelage . . . . .	55
2.2.4.1	Hydrolases . . . . .	56
2.2.4.2	Modifications chimiques post-synthétiques . . . . .	58
<b>3</b>	<b>Division</b>	<b>67</b>
3.1	Modèle de division du pneumocoque . . . . .	68
3.1.1	Sélection du site de division . . . . .	68
3.1.2	L'élongasome . . . . .	70
3.1.3	Le divisome . . . . .	72
3.1.4	Coordination des machineries de synthèse périphérique et septale	73
3.2	Régulation de la division . . . . .	75
3.2.1	Les régulateurs globaux StkP et PhpP . . . . .	75
3.2.2	DivIVA et GpsB . . . . .	76
3.3	Rôle des TA dans la division et la morphogenèse . . . . .	77
<b>4</b>	<b>Marquage métabolique et chimie click</b>	<b>81</b>
4.1	Principe . . . . .	82
4.2	Applications . . . . .	86
<b>II</b>	<b>Résultats</b>	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>Peptidoglycan O-acetylation is functionally related to cell wall biosynthesis and cell division in <i>Streptococcus pneumoniae</i></b>	<b>93</b>
5.1	Contexte . . . . .	94
5.2	Publication . . . . .	95
5.2.1	Résumé . . . . .	96
5.2.2	Introduction . . . . .	98
5.2.3	Methods . . . . .	100
5.2.4	Results . . . . .	105
5.2.5	Discussion . . . . .	120

<b>6</b>	<b>Specific and spatial labeling of choline-containing teichoic acids in <i>Streptococcus pneumoniae</i> by click chemistry</b>	<b>125</b>
6.1	Contexte . . . . .	126
6.2	Publication . . . . .	128
6.2.1	Résumé . . . . .	129
6.2.2	Introduction and results . . . . .	130
6.2.3	Methods . . . . .	138
6.2.4	Supplements . . . . .	142
<b>7</b>	<b>Les polysaccharides de la paroi, TA et PG sont co-synthétisés au site de division</b>	<b>151</b>
7.1	Contexte et objectifs de l'étude . . . . .	152
7.2	Perspectives . . . . .	155
<b>8</b>	<b>Nascent teichoic acids direct the cell surface localization and the activity of the major autolysin LytA</b>	<b>157</b>
8.1	Contexte . . . . .	158
8.2	Publication . . . . .	159
8.2.1	Résumé . . . . .	160
8.2.2	Introduction . . . . .	162
8.2.3	Methods . . . . .	164
8.2.4	Results . . . . .	173
8.2.5	Discussion . . . . .	185
<b>III</b>	<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>193</b>
<b>IV</b>	<b>Annexes</b>	<b>201</b>
	Autocatalytic association of proteins by covalent bond formation : a Bio Molecular Welding toolbox derived from a bacterial adhesin.	203
	Bibliographie	220



## Liste des symboles

- AATGalp* 2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxygalactose
- CBD* Choline Binding Domain, Domaine liant la choline
- CBM* Choline Binding Module, Module liant la choline
- CBP* Choline Binding Protein, Protéine liant la choline
- CBR* Choline Binding Repeat, Répétition liant la choline
- CHAP* Cystéine,Histidine-Dépendante Amidohydrolase/Peptidase
- CPS* Capsular polysaccharide / Capsule polysaccharidique
- CSP* Peptide de Stimulation de la Compétence
- GFP* Green Fluorescent Protein
- GlcNAc* *N*-acetylglucosamine
- LTA* Lipoteichoic acid, acide lipotéichoïque
- MurNAc* acide *N*-acetylmuramique
- OAP* O-Acétylation du Peptidoglycane
- PBP* Penicillin Binding Proteins / Protéines Liant la Pénicilline
- PCho* Phosphorylcholine
- PG* Peptidoglycane
- SEDS* Shape, Elongation, Division and Sporulation / Forme, élongation, division et sporulation
- TA* Acide teichoïque
- UDP* Uridine diphosphate
- WTA* Wall teichoic acid, acide téichoïque lié au peptidoglycane



# Première partie

## Introduction



# 1

## *Streptococcus pneumoniae*

### Sommaire

---

<b>1.1</b>	<b>Classification phylogénétique . . . . .</b>	<b>16</b>
<b>1.2</b>	<b>Physiopathologie et prévalence . . . . .</b>	<b>16</b>
<b>1.3</b>	<b>Prophylaxie et traitements . . . . .</b>	<b>18</b>
1.3.1	Les vaccins ciblant la capsule polysaccharidique . . . . .	18
1.3.2	Antibiotiques et résistances . . . . .	20
1.3.3	Stratégies alternatives en développement . . . . .	21

---



## 1.1 Classification phylogénétique

*Streptococcus pneumoniae*, aussi communément dénommé pneumocoque, est une bactérie à Gram positif appartenant au phylum des Firmicutes, qui comprend principalement des bactéries à Gram positif. *S. pneumoniae* appartient à la classe Bacilles, l'ordre Lactobacilles, la famille *Streptococcaceae* et le genre *Streptococcus*.

## 1.2 Physiopathologie et prévalence

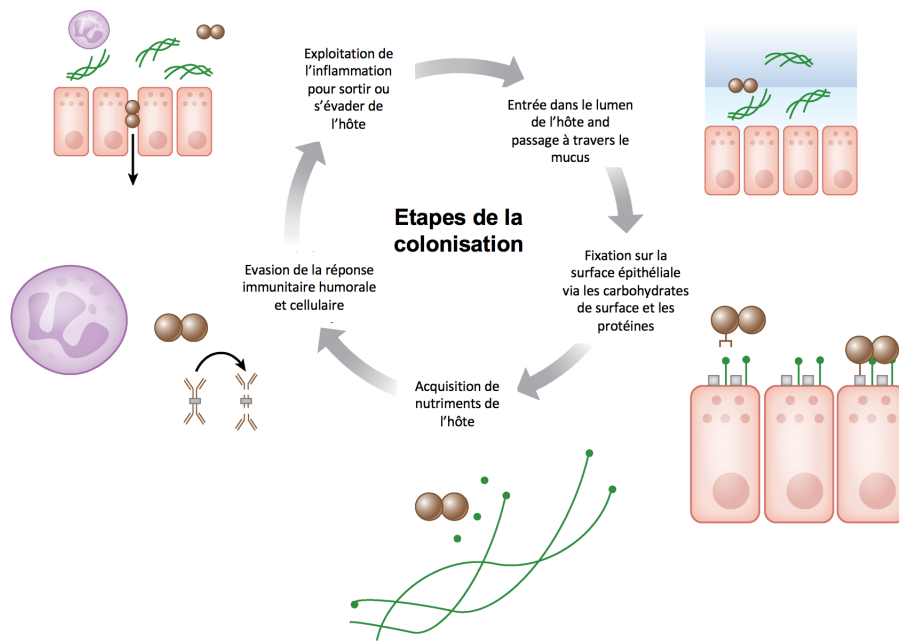
Le pneumocoque est une bactérie commensale de la sphère oro-pharyngée chez L'Homme, isolée chez 5 à 90% des personnes saines. Ce taux de portage varie selon différents critères : l'âge (il est plus important (20 à 60%) et plus long chez les jeunes enfants), l'environnement et la présence d'autres infections respiratoires. La bactérie se transmet par contact direct avec les sécrétions respiratoires des patients et des porteurs asymptomatiques. Aucun vecteur animal ou insecte n'a été identifié.

Les principales étapes de colonisation des voies aériennes supérieures par les bactéries opportunistes tel que *S. pneumoniae* sont représentées dans la figure 1.1 page 17 (pour revue détaillée de toutes les étapes : SIEGEL et WEISER, 2015).

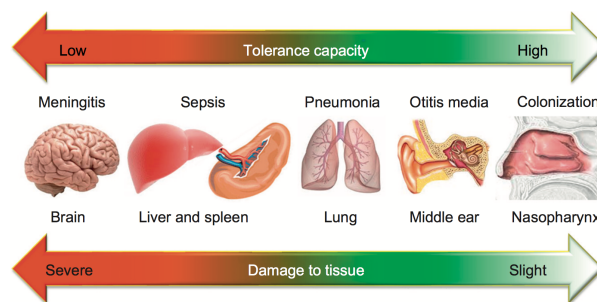
La bactérie peut persister dans les voies aériennes supérieures de l'hôte de façon asymptomatique en restant associée aux surfaces épithéliales, en exploitant les sources de carbone disponibles dans son environnement et en établissant un équilibre avec le système immunitaire inné de l'hôte afin de limiter son élimination par phagocytose. Le pneumocoque devient pathogène de façon opportuniste, lorsqu'il atteint des sites normalement stériles. Les mécanismes utilisés par *S. pneumoniae* pour traverser les tissus épithéliaux, conjonctifs et endothéliaux sont encore mal définis. Plusieurs voies sont probablement exploitées : traversée via les jonctions inter-cellulaires, exploitation d'un processus d'apoptose cellulaire ou co-infection virale.

Le déclenchement d'une réponse immunitaire dépend des tissus infectés. En effet, les différents tissus humains ont une tolérance différente à l'infection par le pneumocoque, ce mécanisme est expliqué dans la figure 1.2 page 17. Le nasopharynx possède une haute tolérance et les dommages induits par le pneumocoque sont donc faibles, ce qui permet la division bactérienne et le maintien d'un portage asymptomatique durant plusieurs semaines, alors que les autres sites sont moins tolérants et les dommages de l'infection plus importants.

*S. pneumoniae* est ainsi responsable de maladies plus ou moins graves en fonctions du site d'infection : des maladies non invasives comme l'otite et la pneumonie



**FIGURE 1.1 – Principales étapes de colonisation des voies aériennes supérieures par *S. pneumoniae*.** Les bactéries pénètrent dans la sphère oro-pharyngée et traversent la couche de mucus. Elles atteignent ainsi la surface épithéliale et se fixent sur les carbohydrates et les protéines exposées à la surface des cellules épithéliales. Les bactéries se nourrissent en exploitant l'inflammation déclenchée chez l'hôte ce qui leur permet de se diviser. Leur persistance au site d'infection implique aussi l'évasion de la réponse immunitaire humorale et cellulaire de l'hôte. Enfin, les pathogènes opportunistes comme *S. pneumoniae* exploitent aussi cette réponse immunitaire pour s'échapper, ce qui permet de favoriser la transmission ou d'envahir d'autres sites afin de persister chez l'hôte. Adapté de SIEGEL et WEISER, 2015.



**FIGURE 1.2 – Tolérance des tissus humains à l'infection par *S. pneumoniae*.** La tolérance est une stratégie de défense de l'hôte qui permet de réduire les effets négatifs de l'infection (facteurs de virulence de la bactérie ou réponse immunitaire exacerbée de l'hôte). Ce mécanisme est différent du système immunitaire par le fait qu'il n'influe pas sur la charge bactérienne. Le nasopharynx présente la plus grande tolérance et donc un risque de dommages des tissus moins élevé. A l'inverse, les oreilles, les poumons, le foie et la rate et enfin le cerveau présente une tolérance de moins en moins élevée induisant respectivement des otites, pneumonies, septicémies et méningites. Adapté de BROWN, HAMMERSCHMIDT et ORIHUELA, 2015.

et des maladies invasives comme la septicémie et la méningite (BRIDY-PAPPAS et al., 2005 ; ATKINSON, WOLFE et HAMBORSKY, 2015).

Au niveau de la population, les personnes les plus touchées sont celles dont le système immunitaire n'est pas complètement fonctionnel, en particulier les enfants de moins de 5 ans et les personnes ayant un système immunitaire déficient comme les personnes âgées ou celles ayant une autre pathologie comme le VIH. Les infections à pneumocoques sont, au niveau mondial, la première cause de pneumonie (CILLONIZ et al., 2016). En 2005, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé que le pneumocoque était responsable de 1,6 million de morts par an dont 0,7 à 1 million étant des enfants de moins de 5 ans, essentiellement dans les pays en voie de développement. Selon un autre rapport de l'OMS en Février 2017, *S. pneumoniae* fait partie des pathogènes de moyenne priorité dans les recommandations de recherche et de développement de nouveaux antibiotiques (TACCONELLI et al., 2017).

## 1.3 Prophylaxie et traitements

Les efforts de développement se sont essentiellement concentrés sur des vaccins ciblant la capsule polysaccharidique (CPS : capsular polysaccharide), facteur de virulence majeur présent chez la plupart des isolats cliniques de pneumocoque. Le but de la vaccination étant de stimuler la production d'anticorps anti-pneumocoque, la réponse immunitaire mucoale et la mémoire immunologique.

### 1.3.1 Les vaccins ciblant la capsule polysaccharidique

La capsule joue un rôle majeur dans la virulence de la bactérie pour échapper au système immunitaire en réduisant l'opsonophagocytose, c'est-à-dire en limitant le dépôt d'anticorps sur la surface bactérienne et donc en empêchant l'activation du système du complément et *in fine* la phagocytose (YOTHER, 2004).

#### 1.3.1.1 Synthèse et composition de la capsule

La synthèse de la capsule dépend d'un locus unique à chaque sérotype, générant une structure chimique polysaccharidique et des propriétés sérologiques spécifiques. A ce jour, plus de 97 sérotypes ont été identifiés.

La biosynthèse de la capsule suit un mécanisme de type "Wzy-dependant" pour tous les sérotypes excepté les sérotypes 3 et 37 qui utilisent une voie de synthèse "synthase dependant". Au niveau chimique, la capsule se compose de répétition de sous-unités comprenant 3 à 4 monosaccharides. Le sérotype se définit par la nature

des monosaccharides, leur ordre, les liaisons glycosidiques et la présence ou non de branches. Pour les sérotypes "synthase-dependant", la composition de la capsule est plus simple, elle est composée d'un (sérotipe 37) ou deux (sérotipe 3) sucres. Pour une description plus complète se référer à GENO et al., 2015.

Les sérotypes sont groupés en séro-groupes lorsqu'ils présentent une réactivité croisée à des anticorps polyclonaux spécifiques d'un sérotipe, mais ils peuvent cependant être distingués par l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Il existe une très grande variabilité de composition de la capsule émanant d'une grande diversité et variabilité génétique.

### 1.3.1.2 Vaccins

Actuellement, deux vaccins PPV23 (non-conjugué) et PCV13 (conjugué) sont commercialisés, ils ciblent respectivement 23 et 13 des sérotypes les plus souvent associées aux infections à pneumocoques (pour revue sur les différents vaccins : DANIELS, ROGERS et SHELTON, 2016). La vaccination des enfants par le PCV13 a permis de réduire de façon significative le taux de portage nasal et les infections au niveau de l'ensemble de la population, même chez les adultes non-vaccinés. Le vaccin PCV13 présente une bonne efficacité dans la prévention des infections invasives, et une moindre efficacité en ce qui concerne les infections non invasives comme l'otite aigüe et la pneumonie. D'autre part, la pression immunologique induite par le vaccin a conduit à la sélection de sérotypes non-vaccinaux responsables d'infections (BERICAL et al., 2016). Ce phénomène de remplacement sérotypique survient soit en révélant des sérotypes précédemment peu fréquents dans la population qui émergent à la place des sérotypes éliminées par l'action vaccinale, soit suite à des événements de recombinaison génétique qui modifient les structures des capsules des sérotypes vaccinaux. De plus, 3 à 19% des porteurs asymptomatiques hébergent des souches non encapsulées qui peuvent causer des infections. Les vaccins sont donc inefficaces contre ces souches dont la prévalence dans la population risque ainsi d'augmenter. Ces souches présentent un taux de recombinaison plus élevé qui peut être responsable d'une acquisition plus importante de résistances aux antibiotiques et de facteurs de virulence (KELLER, ROBINSON et MCDANIEL, 2016).

Ainsi, les vaccins actuels ne permettent pas une protection qui couvre toutes les souches virulentes de pneumocoques. Afin de résoudre ce problème, il est nécessaire de comprendre les mécanismes physiologiques des infections invasives et non invasives, de développer des vaccins qui agissent contre l'ensemble des infections et qui ciblent comme antigène des protéines de *S. pneumoniae* présentes chez la totalité des souches. La synthèse d'un vaccin ciblant à la fois les capsules et plusieurs protéines

serait d'autant plus efficace (FELDMAN et ANDERSON, 2016). Plusieurs protéines exposées à la surface des pneumocoques sont considérées comme des candidats antigènes intéressants (DANIELS, ROGERS et SHELTON, 2016) dont plusieurs choline binding proteins, une famille de protéine décrite page 36.

### 1.3.2 Antibiotiques et résistances

Les infections à pneumocoque ont été traitées pendant de nombreuses années par la pénicilline ou l'ampicilline auxquels la bactérie était très sensible lors de l'introduction de la pénicilline dans les années 1940. Cependant, les résistances aux antibiotiques, observées pour la première fois chez *S. pneumoniae* dans les années 1960 (HANSMAN et ANDREWS, 1967), ont continué d'augmenter jusqu'à aujourd'hui (SCHROEDER et STEPHENS, 2016). L'émergence des résistances à la pénicilline et aux autres  $\beta$ -lactamines chez le pneumocoque dans les années 1980 et 1990 a été contrecarrée par l'utilisation massive d'autres familles d'antibiotiques telles que les macrolides ou les fluoroquinolones, ce qui a inévitablement conduit à l'émergence de souches résistantes à ces antibiotiques (pour revue sur les résistances aux différents antibiotiques de *S. pneumoniae* : BROWN, HAMMERSCHMIDT et ORIHUELA, 2015 chapitre 2). Les mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines seront détaillés page 54. L'apparition des résistances provient de la pression de sélection associée à l'utilisation d'antibiotiques et de l'expansion clonale et la propagation des souches de pneumocoques multi-résistantes. *S. pneumoniae* possède un mécanisme physiologique nommé compétence naturelle pour la transformation (cf page 43) qui lui permet d'intégrer de l'ADN exogène et participe fortement à l'acquisition et la propagation des résistances aux antibiotiques. L'utilisation des vaccins ciblant la capsule polysaccharidique a permis de réduire significativement les infections causées par les pneumocoques résistants mais les clones résistants non ciblés par les vaccins continuent d'augmenter (KIM et al., 2016).

Les causes de l'augmentation et de la dissémination des résistances aux antibiotiques sont complexes et multifactorielles (revue : RIOS et al., 2016). Les causes majeures sont la surconsommation, les mauvaises prescriptions, l'automédication (choix du médicament et/ou de la dose), l'utilisation massive d'antibiotiques dans l'agriculture et l'élevage, la croissance de la durée de vie de la population et l'augmentation du nombre de maladies chroniques et nosocomiales. L'ensemble de ces facteurs favorisent la sélection de bactéries pathogènes mais également commensales résistantes aux antibiotiques. Il a notamment été montré que les streptocoques commensaux *Streptococcus mitis* et *Streptococcus oralis* servent de réservoir à *S. pneumoniae* dans l'acquisition de gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines (JENSEN et

al., 2015).

### **1.3.3 Stratégies alternatives en développement**

Les résistances aux antibiotiques, en constante augmentation, sont un problème cruciale de santé publique à l'échelle mondiale. Aussi bien dans le cadre de la médecine de ville que dans le milieu hospitalier, il est urgent d'améliorer le diagnostic des infections à pneumocoques, ainsi que le traitement, notamment dans le contrôle de l'utilisation des antibiotiques. De plus, il est essentiel de développer de nouvelles stratégies pour lutter contre l'augmentation des souches résistantes aux antibiotiques. Les principales approches évaluent des domaines d'intérêt tels que les bactériophages, les lysines, les peptides antimicrobiens, les anticorps anti-bactériens, les vaccins, la radioimmunothérapie et la stratégie anti-virulence (WIZEMANN et al., 2001 ; RAJAGOPAL et WALKER, 2015 ; RIOS et al., 2016).

Les résultats présentés dans ce manuscrit étudient des mécanismes pouvant s'inscrire dans plusieurs de ces stratégies par l'étude d'acteurs majeurs de la virulence présents à la surface bactérienne.



# 2

## La paroi

### Sommaire

---

<b>2.1</b>	<b>Acides teichoïques</b>	<b>25</b>
2.1.1	Présentation générale	25
2.1.2	Biosynthèse et structure des acides téichoïques chez <i>Streptococcus pneumoniae</i>	27
2.1.3	Rôle de la choline	35
2.1.4	Choline binding proteins	36
<b>2.2</b>	<b>Peptidoglycane</b>	<b>49</b>
2.2.1	Rôle	49
2.2.2	Composition - Synthèse	49
2.2.3	Mode d'action des $\beta$ -lactamines et résistance	54
2.2.4	Maturation et remodelage	55

---



La paroi est la structure entourant la membrane plasmique de la bactérie qui a pour rôles principaux de protéger la cellule contre la lyse osmotique, de maintenir la forme de la bactérie et de la protéger des menaces extérieures. Ces dangers sont soit d'ordre chimique, les antibiotiques en sont l'exemple emblématique, soit émanent des défenses immunitaires innées de l'hôte via le lysozyme et le système du complément, soit proviennent d'attaques directes d'autres bactéries via le système de sécrétion de type VI ou d'infection par les bactériophages.

La paroi de *Streptococcus pneumoniae* est composée des acides teichoïques (TA) et d'une épaisse couche de peptidoglycane (PG) sur laquelle s'ancrent différents composants :

- Les TA covalamment attachés au peptidoglycane nommés WTA (wall teichoic acid).
- La capsule qui est ancrée sur le PG par une liaison glucosidique directe via le carbone 6 du *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) (LARSON et YOTHER, 2017).
- Les pili, structures filamentaires qui interagissent avec la matrice extracellulaire et les cellules eucaryotes de l'hôte, et sont ancrés sur le PG par des sortases (pour revue chez les bactéries à Gram positif KHARE et V. L. NARAYANA, 2017).
- De nombreuses protéines de surface impliquées dans la division ou l'interaction avec l'environnement. Quatre familles ont été définies en fonction de leur mode d'attachement à la surface bactérienne (TETTELIN et al., 2001 ; PÉREZ-DORADO, GALAN-BARTUAL et HERMOSO, 2012) :
  - **Les lipoprotéines.** Ces protéines ancrées à la membrane par une ancre lipidique possèdent des motifs structuraux spécifiques dont un peptide signal N-terminal contenant une région d'acides aminés chargés positivement, une séquence hydrophobe et un motif "lipobox" (séquence LAAC) qui précède la cystéine nécessaire à leur ancrage covalent sur un phospholipide (HARRINGTON et SUTCLIFFE, 2002). Une cinquantaine ont été identifiées chez le pneumocoque et nombreuses d'entre elles seraient impliquées dans la virulence et/ou la composition des transporteurs ABC (ATP-Binding-Cassette) (pour revue : KOVACS-SIMON, TITBALL et MICHELL, 2011 ; BROWN, HAMMERSCHMIDT et ORIHUELA, 2015).
  - **Les protéines ancrées de façon covalente sur le peptidoglycane** qui possèdent le motif consensus LPXTG (X étant un acide aminé variable) reconnu par la Sortase A qui réalise leur ancrage. Jusqu'à 18 protéines (en fonction de la souche) ont été identifiées en fonction des souches de *S. pneumoniae* (LÖFLING et al., 2011).

- **Les protéines liant la choline (CBPs, Choline Binding Proteins)** qui se fixent sur les acides téichoïques (FROLET et al., 2010). Entre 13 et 16 protéines sont présentes en fonction de la souche de pneumocoque. Cette famille de protéine est détaillée page 2.1.4.
- **Les protéines de surface non classiques (Non-classical surface proteins, NCSPs)** qui n'ont pas de peptide signal classique ni de motif d'ancrage à la membrane et possèdent de multiples fonctions (moonlighting proteins) (BERGMANN et HAMMERSCHMIDT, 2006).

## 2.1 Acides teichoïques

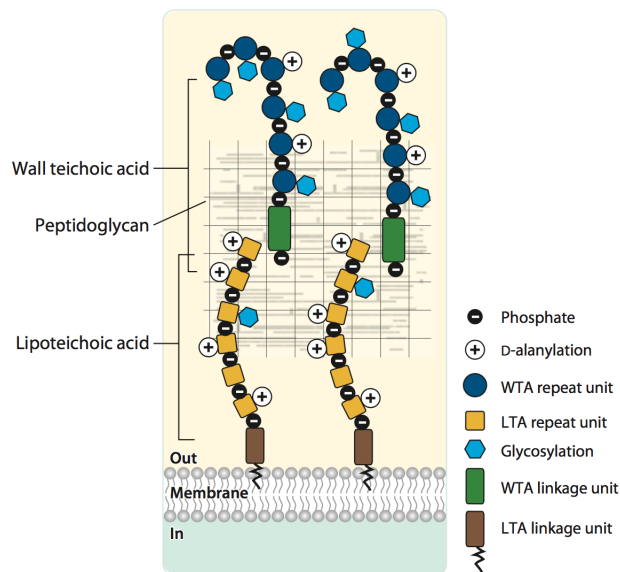
### 2.1.1 Présentation générale

Les acides téichoïques (TA) sont des glycopolymères découverts chez les bactéries à Gram positif en 1958 (ARMSTRONG et al., 1958) qui représentent environ la moitié du poids total sec de la paroi (NEUHAUS et BADDILEY, 2003). Ils possèdent des fonctions cruciales en contrôlant la rigidité et la porosité de la paroi et en jouant un rôle dans la morphogénèse et la division cellulaire. Ils contribuent aussi à l'homéostasie des cations, à l'interaction avec le système immunitaire, à la protection contre les peptides anti-microbiens et les antibiotiques, ce qui leur confère un rôle important dans la virulence.

Deux types de TA ont été identifiés : les acides lipotéichoïques (LTA, lipoteichoic acid) sont liés à la membrane plasmique via un Glc-diacylglycérol glycolipide, et les WTA (wall teichoic acid) sont covalamment attachés au peptidoglycane (Figure 2.1 page 26) (pour revues : NEUHAUS et BADDILEY, 2003 ; WEIDENMAIER et PESCHEL, 2008 ; BROWN, SANTA MARIA et WALKER, 2013 ; PERCY et GRÜNDLING, 2014 ; CHAPOT-CHARTIER et KULAKAUSKAS, 2014 ; RAJAGOPAL et WALKER, 2015).

Chez de nombreuses espèces bactériennes les LTA et WTA ont des structures chimiques différentes qui possèdent dans les deux cas une charge globale négative qui aurait une importance dans leurs fonctions biologiques (BROWN, SANTA MARIA et WALKER, 2013 ; PERCY et GRÜNDLING, 2014). Chez les espèces de Lactobacilles, Bacilles et Staphylocoques, la biosynthèse des WTA et LTA dépend de voies métaboliques distinctes. La synthèse des WTA est contrôlée par les gènes *tag* et *tar* (pour revue : BROWN, SANTA MARIA et WALKER, 2013) et celle des LTA par différents gènes dont *LtaS* est la synthase clé responsable de leur polymérisation (GRÜNDLING et SCHNEEWIND, 2007 ; SCHIRNER et al., 2009).

Les TA du pneumocoque, anciennement nommés fraction ou polysaccharide "C", ont été décrit pour la première fois en 1930 (TILLET, GOEBEL et AVERY, 1930)



**FIGURE 2.1 – Schéma de représentation des acides téichoïques dans la paroi des bactéries à Gram positif.** Les WTA sont attachés de façon covalente au peptidoglycane alors que les LTA sont ancrés à la membrane. Source : BROWN, SANTA MARIA et WALKER, 2013.

mais caractérisé comme étant des TA en 1967 (BRUNDISH et BADDILEY, 1967). *S. pneumoniae* possède la particularité de produire par la même voie de biosynthèse des WTA et LTA de structure identique (FISCHER et al., 1993 ; DENAPAITE et al., 2012). Leur composition chimique, plus complexe que celle des WTA et LTA d'autres bactéries à Gram positif contiennent en outre des résidus de choline, une caractéristique qui a longtemps été considérée comme étant spécifique à *S. pneumoniae*. Par la suite, différentes études ont montré la présence de molécules de choline associées aux TA d'espèces de Streptocoques proches de *S. pneumoniae* et appartenant au groupe Mitis telles que *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis*, *S. oralis* et *S. infantis*. Ces espèces bactériennes composent la flore commensale de la cavité buccale et de la sphère oropharyngée (KILIAN et al., 2008 ; DENAPAITE et al., 2012 ; GISCH et al., 2015).

La délétion des WTA ou des LTA est rendue possible chez *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* par l'inactivation des gènes précoces des voies de biosynthèse respectives, mais la double délétion s'avère létale, ce qui indique que les TA sont essentiels dans la formation de la paroi et/ou la survie de la cellule (D'ELIA et al., 2006a ; D'ELIA et al., 2006b ; GRÜNDLING et SCHNEEWIND, 2007 ; SCHIRNER et al., 2009 ; OKU et al., 2009). Chez *S. pneumoniae*, plusieurs gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des TA (détaillée page 27) sont essentiels (LIU et al., 2017).

L'étude de différentes protéines impliquées dans la synthèse des TA a montré

qu'ils sont impliqués dans la morphogénèse et la division. LytR, une protéine qui serait impliquée dans l'ancrage des WTA ou des LTA, est essentielle pour la formation correcte du septum (JOHNSBORG et HÅVARSTEIN, 2009; EBERHARDT et al., 2012). La délétion de la protéine RafX (ou TarP) impliquée dans la biosynthèse des WTA, perturbe la croissance, l'autolyse, la division et la morphologie bactérienne. L'étude de ce mutant montre aussi que les WTA sont importants dans l'adhérence aux cellules épithéliales et la virulence (WU et al., 2014; XU et al., 2015). Plusieurs études ont montré que les bactéries colonisant l'hôte possèdent une quantité plus importante de TA à la surface bactérienne comparées aux bactéries cultivées en culture liquide (WEISER et al., 1994; WEISER et al., 1996; KIM et WEISER, 1998; XU et al., 2015). Un mécanisme aussi observé chez *S. aureus* dont la virulence est augmentée par une plus grande quantité de WTA à la surface bactérienne, ces derniers masquant les épitopes bactériens et prévenant la fixation d'anticorps (GAUTAM et al., 2016; WANNER et al., 2017).

Les LTA sont impliqués dans la formation de biofilms et la protection contre les peptides antimicrobiens chez *Enterococcus faecalis* (FABRETTI et al., 2006) ou encore dans la fixation des bactériophages chez certaines bactéries lactiques (CHAPOT-CHARTIER et KULAKAUSKAS, 2014). Les TA de *S. pneumoniae* sont impliqués dans la résistance à des peptides antimicrobiens cationiques (KOVÁCS et al., 2006). Cependant, aucun rôle spécifique des LTA n'a pu être déterminé chez *S. pneumoniae*, mais étant donné qu'il possède la même structure que les WTA leur rôle est peut être identique. De plus, les résidus de choline qui décorent les TA de *S. pneumoniae* participent de façon importante à leur rôle dans la virulence (cf page 35).

L'ensemble de ces données montrent que les TA ont un rôle important pour la physiologie et la pathogénèse bactérienne, ils représentent une cible d'intérêt pour le développement de nouvelles molécules anti-microbiennes et de vaccins. Ces développements requièrent cependant de mieux comprendre leurs mécanismes d'action et de biosynthèse.

### 2.1.2 Biosynthèse et structure des acides téichoïques chez *Streptococcus pneumoniae*

En associant des recherches bioinformatiques, les mutations connues dans des souches de pneumocoques mutantes indépendantes de la choline et le modèle de la structure des LTA, DENAPATE et al., 2012 ont redéfini la voie de biosynthèse des TA. Le modèle complet de synthèse des LTA et WTA proposé contient seize gènes répartis dans quatre régions du génome. Plus récemment, deux nouveaux gènes ont été identifiés en utilisant la technique d'interférence CRISPR et le phénotypage

haut débit afin d'identifier de nouveaux gènes essentiels de la souche D39 de *S. pneumoniae* (LIU et al., 2017). Le schéma 2.2 issu de BROWN, HAMMERSCHMIDT et ORIHUELA, 2015, page 29 décrit les étapes de synthèse des acides téichoïques.

La première étape de la biosynthèse est le transfert d'un AATGalp-1-phosphate d'un UDP-AATGalp à un transporteur lipidique undecaprenyle phosphate, ce transfert est prédit pour être effectué par Spr1655 (UDP : uridine diphosphate; AATGalp : 2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxygalactose). L'UDP-AATGalp serait converti à partir d'un UDP-Glc $p$ NAc par Spr0092 et Spr1654. Ensuite, un glucose, un ribitol-phosphate synthétisé par TarI/TarJ, et deux résidus Gal $p$ NAc sont respectivement ajoutés par Spr0091, LicD3 (Spr1125) et Spr1123/Spr1124 prédites comme étant des glycosyltransférases. L'étape suivante nécessite l'incorporation de résidus phosphorylcholine (PCho). Pour cela la choline exogène est importée dans le cytoplasme par le transporteur membranaire LicB, phosphorylée par la choline kinase LicA et activée par la cytidylyl transférase LicC pour former du CDP-choline utilisé comme substrat par LicD1 (Spr1151) et LicD2 (Spr1152) qui l'incorporent en position O6 des deux résidus Gal $p$ NAc. L'unité de répétition est ainsi complète. Récemment, LIU et al., 2017 ont identifié TarP (spd1198) et TarQ (spd1197) comme étant responsable de la polymérisation des unités de répétitions qui a probablement lieu du côté cytoplasmique de la membrane. La protéine TarP correspond à RafX, une protéine dont l'étude a précédemment montré qu'elle est impliquée dans la biosynthèse des WTA (WU et al., 2014). La translocation à la membrane externe serait réalisée par TacF (Spr1150), une protéine possédant 14 hélices transmembranaires prédites et appartenant à une famille de protéines membranaires intégrales impliquées dans la production de polysaccharides et à un cluster de groupes orthologues de protéines impliquées dans l'export de O-antigènes et acides téichoïques (DAMJANOVIC et al., 2007; GONZÁLEZ et al., 2008; KHARAT et al., 2008; DENAPAITE et al., 2012). La dépendance à la choline du pneumocoque proviendrait de l'étape de translocation des TA à la surface par TacF. En effet, il a été montré qu'une simple mutation dans le gène codant pour TacF permet à la souche mutante de devenir indépendante de la choline. L'hypothèse est donc que TacF aurait une spécificité pour les TA chargés en choline, alors que la protéine mutée est capable de transloquer des TA chargés et non chargés en choline (DAMJANOVIC et al., 2007). Cette spécificité de TacF assurerait l'exposition à la surface uniquement de TA chargés en choline qui est essentielle à la physiopathologie du pneumocoque.

Suite à la translocation dans l'espace extracellulaire, les chaînes d'acides téichoïques liées à un undecaprenyl diphosphate sont soit transférées à un ancrage lipidique par la glucosyltransférase Spr0982 pour former les lipotéichoïques acides

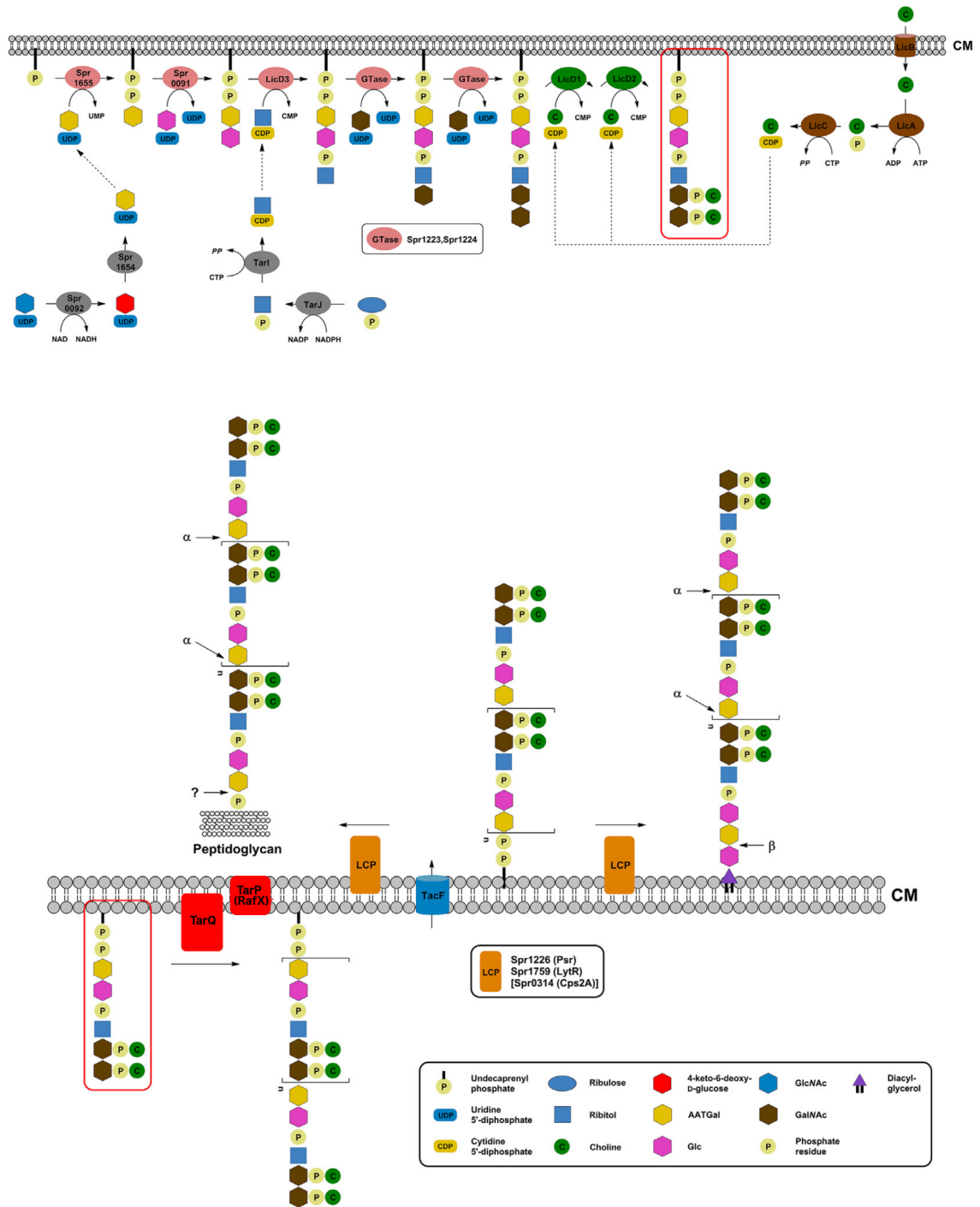


FIGURE 2.2 – Schéma de biosynthèse des acides téichoïques *S. pneumoniae* (gènes et protéines de la souche R6). AATGal, 2-acétamido-4-amino-2,4,6-tridéoxygalactose; CM, membrane cytoplasmique; CMP, cytidine-monophosphate; GalNAc, *N*-acétylgalactosamine; Glc, glucose; GlcNAc, *N*-acétylglucosamine; Gtase, glycosyl- transférase; LCP, protéine de la famille LytR-Cps2A-Psr; UMP, uridine-monophosphate. Adapté de BROWN, HAMMERSCHMIDT et ORIHUELA, 2015.

(LTA), soit transférées au peptidoglycane par une liaison phosphodiester (FISCHER et al., 1993) pour former les WTA (Wall teichoic acids). Les protéines supposées être impliquées dans la réalisation de ces étapes seraient LytR (Spr1759) et PsR (Spr1226) qui appartiennent à la famille des protéines LCP (LytR-Cps2A-Psr). L'activité ligase de cette famille de protéines a récemment été prouvée chez *S. aureus* par des expériences *in vitro* (SCHAEFER et al., 2017). LytR est synthétisée constitutivement au cours de la croissance et sa délétion induit d'importants défauts morphologiques dus à des problèmes de formation du septum (JOHNSBORG et HÅVARSTEIN, 2009). Le mutant *PsR* a été construit au laboratoire et présente aussi des défauts de division, les bactéries forment des chaînettes avec un septum qui ne se ferme pas entièrement (données non publiées). Ces deux protéines seraient aussi impliquées, avec Cps2A, dans la rétention de la capsule sur le peptidoglycane dans la souche encapsulée D39 (EBERHARDT et al., 2012).

Il a été montré que des cellules dont le gène codant l'autolysine LytA a été inactivé et traitées à la pénicilline relarguent dans le milieu du PG non réticulé et des TA non reliés au PG. Cette observation suggère que le substrat de la ligase qui ancre les TA sur le PG serait préférentiellement du PG réticulé. En régulant le niveau de transpeptidation du PG, une transpeptidase aurait donc la capacité de réguler simultanément l'incorporation de PG et de TA et pourrait ainsi fonctionner comme un point de contrôle de la coordination de la biosynthèse de la paroi (FISCHER et TOMASZ, 1984).

Enfin, les TA peuvent être modifiés par l'insertion de résidus D-alanine ajoutant une charge positive à la paroi, ce qui joue un rôle dans la virulence de la bactérie (WARTHA et al., 2007) et protège les cellules de l'action des peptides cationiques antimicrobiens (KOVÁCS et al., 2006). Cependant, une étude complète de la structure des LTA de *S. pneumoniae* a été effectuée en 2013 et montre que contrairement à ce qui était précédemment proposé, les TA du pneumocoque ne sont pas glycosylés par des résidus GalNAc (*N*-acetyl galactosamine) en position C4 des ribitols comme cela est le cas chez d'autres bactéries (DRAING et al., 2006 ; GISCH et al., 2013) .

La structure complète des TA de *S. pneumoniae* est présentée figure 2.3 page 32. Les WTA et LTA possèdent la même composition (FISCHER et al., 1993) et l'analyse de la structure des WTA montre que les chaînes de TA sont majoritairement composées de 6 à 7 unités de répétition. Concernant la charge en choline, des WTA entièrement chargés en choline (deux par unité de répétition) ou des chaînes auxquelles il manquait jusqu'à quatre cholines ont été détectées (BUI et al., 2012), indiquant qu'une régulation du taux de décoration des TA par la choline pourrait

être envisagée.

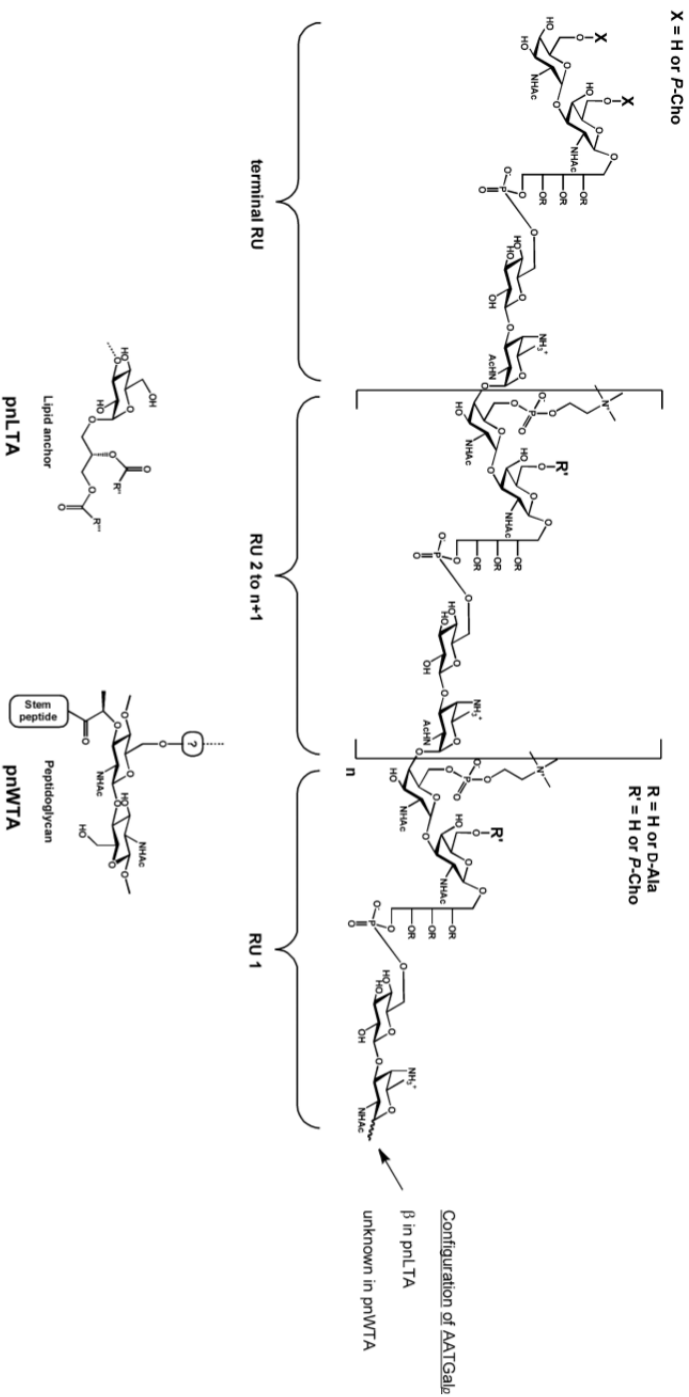
### 2.1.2.1 Localisation de la biosynthèse des TA

Les premières preuves de la synthèse équatoriale des acides téichoïques ont été obtenues par des techniques de radioautographie sur cellules cultivées en présence de choline radioactive (BRILES et TOMASZ, 1970). Après incubation dans la choline radioactive  $^3\text{H}$ , les cellules étaient mises en culture en présence d'éthanolamine, un homologue structurale de la choline afin de réaliser une chasse. Les résultats de microscopie conventionnelle et électronique sont présentés figure 2.4 page 33 et le modèle proposé d'après ces observations figure 2.5 page 34. Les résultats montrent que les acides téichoïques sont synthétisés dans la région équatoriale et que leur ségrégation à la surface bactérienne coïnciderait avec celle du peptidoglycane.

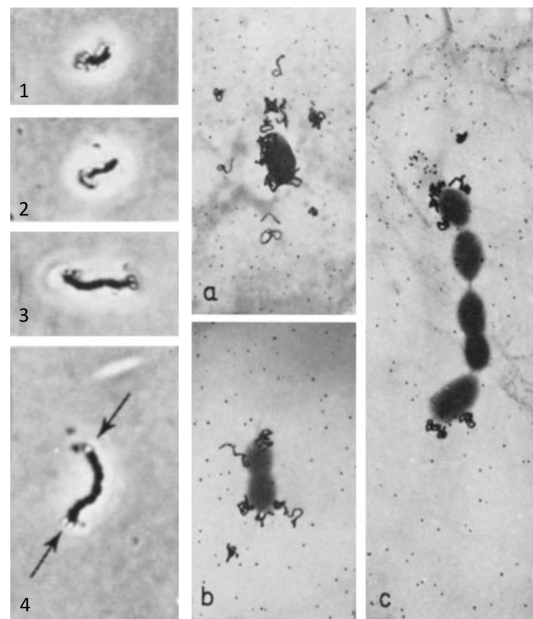
Différentes protéines impliquées dans la synthèse de la choline ont par la suite été localisées, notamment grâce au développement d'un plasmide permettant d'exprimer des protéines de manière ectopique, sous promoteur inductible au zinc, et de les fusionner en N-terminal ou C-terminal à la GFP+ (Green Fluorescent Protein +, SCHOLZ et al., 2000) (EBERHARDT et al., 2009). Les résultats montrent que LicB, responsable de l'import de la choline, possède une localisation membranaire. TarI, TarJ, LicA et LicC qui sont impliquées dans la métabolisation de la choline sont localisées dans le cytoplasme. LicD1 et LicD2, qui chargent la choline sur les unités de répétition des TA, sont prédites pour être cytoplasmiques mais se localisent à la membrane, ce qui suggèrent qu'elles sont associées à la membrane (EBERHARDT et al., 2009). Les protéines transmembranaires TarP et TarQ se localisent à la membrane (LIU et al., 2017). Enfin, LytR et PsR qui accrocheraient les TA à la membrane ou au peptidoglycane se localisent au septum (EBERHARDT et al., 2012). Ces données suggèrent que la métabolisation de la choline a lieu dans le cytoplasme, que le chargement des précurseurs des TA a lieu à la membrane mais sans localisation spécifique, puis ces derniers, attachés à leur ancre lipidique, diffusent dans la membrane jusqu'au site de division où aurait lieu la translocation des acides téichoïques puis leur ancrage à la surface bactérienne.

Cependant, jusqu'à présent aucune technique n'a permis de localiser précisément les TA à la surface bactérienne sur cellules vivantes. L'article présenté chapitre 6 page 125, décrit une méthode développée au laboratoire basée sur la chimie click et l'utilisation d'une choline modifiée, afin de localiser *in vivo* les TA. Les notions de bases de chimie click seront détaillées chapitre 4 page 81.

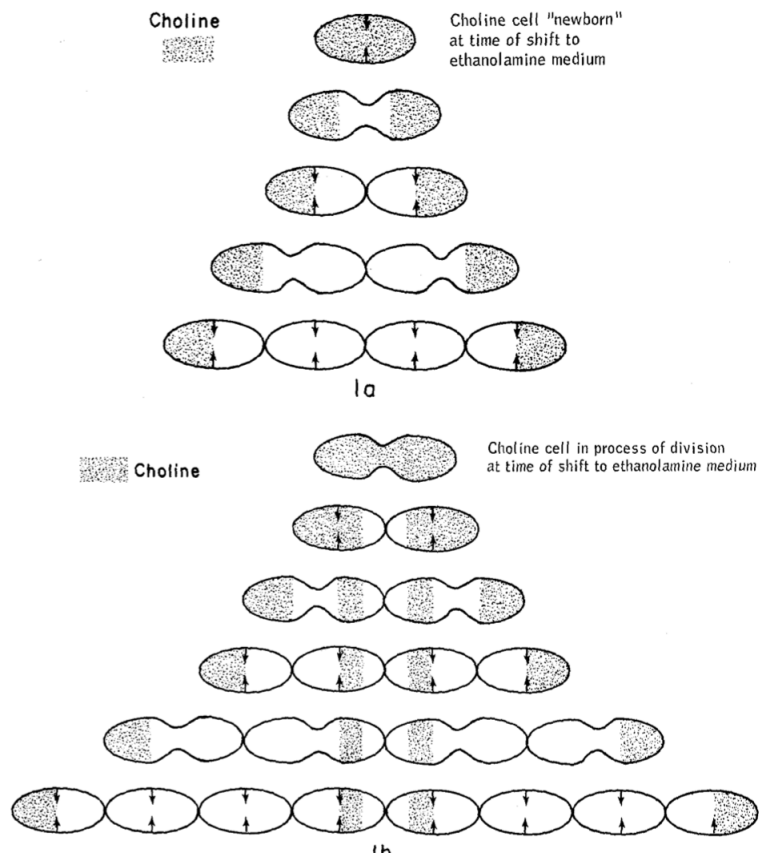




**FIGURE 2.3 – Structure des acides téichoïques de *S. pneumoniae*.** Les unités de répétitions (RU 2 à n+1) contiennent la même structure et peuvent aller jusque 6 répétitions, alors que l'unité de répétition terminale peut contenir ou non une phosphocholine 6-O-PCho sur les GalpNAc. Les unités de répétitions sont reliées par une liaison  $\alpha$ -glycosidique. Les groupements hydroxyles des ribitols peuvent être substitués par une D-alanine (R). Les acides lipotéichoïques sont reliés à la membrane par une ancre lipidique (configuration  $\beta$ -1). R", R"' : résidus alkyle ou alkényle des chaînes d'acides lipidiques dans le diacylglycérol (DAG) de l'ancre lipidique. Les acides téichoïques ancrés au peptidoglycane sont accrochés sur le carbone 6 du MurNAc des chaînes glycanes, mais leur configuration de liaison est inconnue. RU : Unité de répétition. n : nombre d'unités de répétitions. pNLTA : lipotéichoïque du pneumocoque. pNWTa : acide téichoïque ancré au PG du pneumocoque. Source : BROWN, HAMMERSCHMIDT et ORIHUELA, 2015.



**FIGURE 2.4 – Localisation de la synthèse des TA par marquage radioactif de la choline en "pulse chase" (BRILES et TOMASZ, 1970).** Les bactéries ont été marquées avec de la choline radioactive  $^3\text{-H}$  (pulse) puis transférées dans un milieu contenant de l'éthanolamine (chase). **1, 2, 3, 4** : images de microscopie conventionnelle (x 1600) de pneumocoques après 0 à 3 générations après transfert en éthanolamine. **a, b, c** : images de pneumocoques en microscopie électronique (x 8000), 0 à 4 générations après transfert en éthanolamine. Les flèches indiquent les grains d'argent localisant la choline radioactive. On observe que les grains se localisent aux pôles des chaînes.



**FIGURE 2.5** – Premier modèle de la synthèse septale et de la ségrégation des acides téichoïques à la surface de *S. pneumoniae*. Le modèle présente la ségrégation de la paroi contenant de la choline marquée (zones grisées) durant la chasse, en fonction de deux stades de division des cellules au moment du pulse (1a : cellule au premier stade de division, 1b : cellule en cours de division) d'après les observations en microscopie. Les zones blanches correspondent à la paroi synthétisée durant la chasse. Les flèches indiquent les zones de croissance équatoriale. Source : BRILES et TOMASZ, 1970.

### 2.1.3 Rôle de la choline

*S. pneumoniae* est la seule bactérie connue dont la croissance dépend entièrement de la présence de choline (RANE et SUBBAROW, 1940). Cependant, cette bactérie ne peut pas la synthétiser et dépend donc entièrement de l'apport extérieur de choline. La choline est un nutriment essentiel et une molécule présente en abondance dans les cellules eucaryotes. Elle est notamment l'un des composants des phosphatidylcholines, un phospholipide de la membrane des cellules eucaryotes. Le pneumocoque utilise donc la choline exogène présente dans son milieu environnant et la métabolise pour l'incorporer, de façon exclusive, dans les TA (TOMASZ, 1967; BRUNDISH et BADDILEY, 1968; MOSSER et TOMASZ, 1970; BRILES et TOMASZ, 1973).

Son rôle a été mis en évidence dans différents mécanismes physiologiques du pneumocoque. La choline est un amino alcool qui peut être remplacé par un analogue structurale tel que l'éthanolamine, ce qui permet d'étudier la physiologie bactérienne en absence de choline. Dans cette condition de culture, la croissance du pneumocoque est normale mais différentes modifications physiologiques sont observées. Il n'y a plus de dissociation des cellules filles, les cellules forment de longues chaînes au lieu de diplocoques. Il n'y a plus d'autolyse en phase stationnaire et les bactéries ne sont plus compétentes (TOMASZ et MOSSER, 1966) (le mécanisme de compétence sera détaillée page 43). Ces modifications s'avèrent réversibles en rajoutant de la choline dans le milieu (TOMASZ, 1968). Enfin, la choline est essentielle pour la virulence de la bactérie. Elle permet la colonisation de la sphère oro-pharyngée en participant à l'adhérence et l'invasion des cellules de l'hôte (KHARAT et TOMASZ, 2006) ainsi qu'à l'échappement au système immunitaire (GEHRE et al., 2009).

La choline est donc essentielle pour différents mécanismes physiologiques du pneumocoque et pour sa virulence. Ce rôle est à la fois direct et indirect. Les groupements N-triméthylamine des résidus de choline sur les TA apportent une charge positive à la surface bactérienne qui pourrait contribuer à certains de ces mécanismes. Les molécules de phosphorylcholine (PCho) associées aux TA sont reconnues par différentes protéines : la protéine C-réactive (CRP) (VOLANAKIS et KAPLAN, 1971), une protéine du système immunitaire présente massivement dans le sérum lors d'une inflammation en réponse à une infection ou une blessure, et permettant l'activation du système du complément. Plus récemment, il a été montré au laboratoire que les PChos sont le ligand de la L-ficoline qui induit l'activation du système du complément par la voie des lectines (VASSAL-STERMANN et al., 2014). Les PChos se fixent aussi sur le récepteur du facteur d'activation plaquettaire (PAF), ce qui augmente l'adhésion et contribue à l'invasion des cellules (CUNDELL et al., 1995). Le nombre de PCho dans les unités de répétitions des acides téichoïques varie de

une à deux cholines en fonction des souches et la quantité d'acides téichoïques à la surface bactérienne est aussi variable (KARLSSON, JANSSON et SKOV SØRENSEN, 1999). L'importance du rôle des résidus PCho dans la virulence implique que leur métabolisme et la décoration des acides téichoïques, notamment par CbpE (cf p.47), doivent être finement régulé afin de promouvoir l'infection (JOHNSTON et al., 2016).

Le rôle de la choline est aussi indirect et vient du fait que les résidus de choline des acides téichoïques sont le ligand d'une famille de protéines liant la choline (CBPs, Choline Binding Proteins) qui jouent des rôles essentiels dans la physiologie bactérienne et la virulence.

### 2.1.4 Choline binding proteins

Les CBPs forment une famille de protéines de surface majeure du pneumocoque dont certaines sont aussi présentes chez les espèces commensales proches *Streptococcus oralis* et *Streptococcus mitis* et chez certains bactériophages du pneumocoque (GARCÍA et al., 1988 ; MARTÍN, LÓPEZ et GARCÍA, 1998 ; HAKENBECK et al., 2009 ; MADHOUR, MAURER et HAKENBECK, 2011). Une CBP est composée d'un domaine catalytique spécifique et d'un domaine liant la choline (CBD, choline binding domain), non covalamment fixé aux PCho des TA, composé d'un nombre variable de modules liant la choline (CBM, choline binding module) composés d'unités de répétitions liant la choline (CBR, choline binding repeat) d'environ 20 acides aminés.

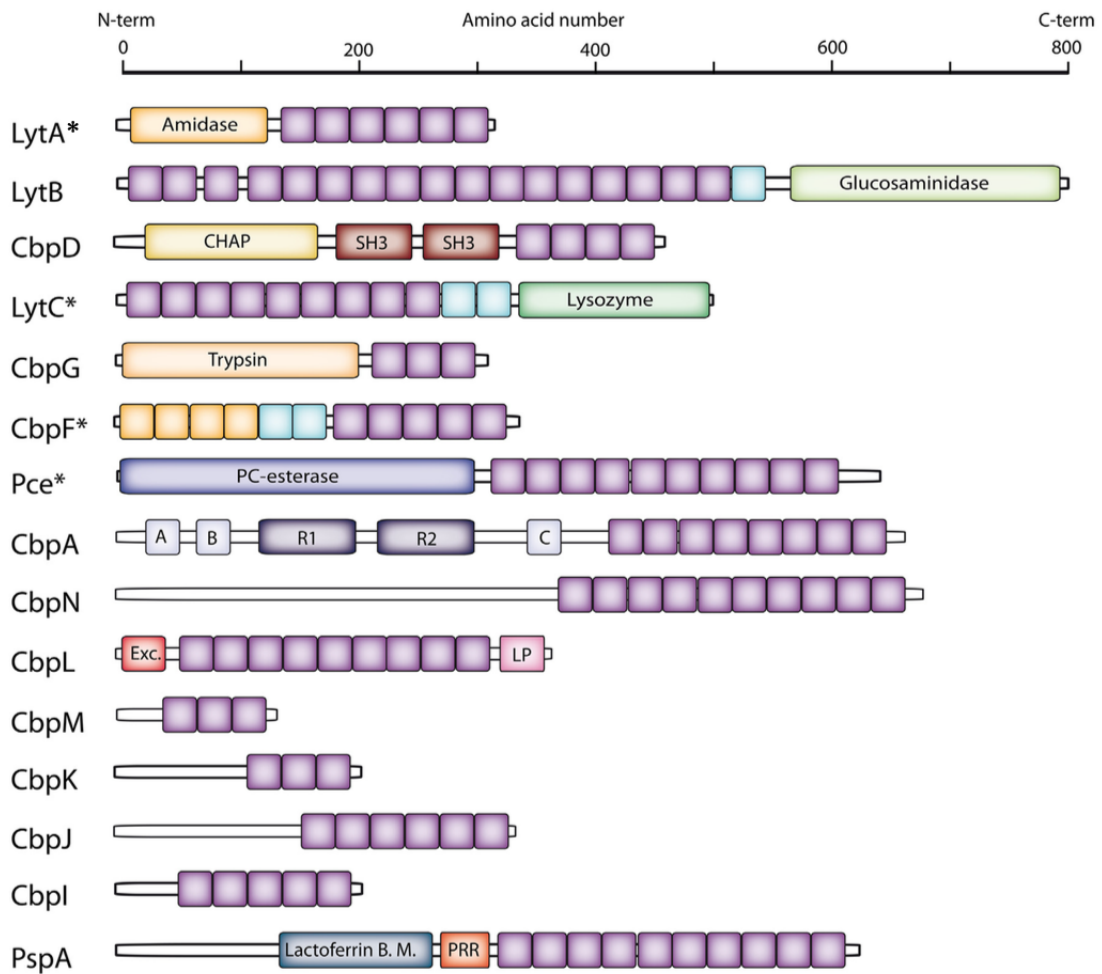
Le nombre de CBPs varie de 13 à 16 en fonctions des souches de pneumocoque (FROLET et al., 2010). La figure 2.6 page 37 présente les différentes CBPs et leur structure modulaire.

Les CBPs jouent des rôles importants pour la physiologie du pneumocoque et de la paroi, et certaines sont aussi des facteurs de virulence intervenant dans la colonisation et l'interaction avec l'hôte (HAVA et CAMILLI, 2002 ; FROLET et al., 2010 ; ANDRE et al., 2017).

#### 2.1.4.1 LytA et l'autolyse en phase stationnaire

- **Rôle :**

Une caractéristique du pneumocoque découverte au début du siècle dernier est l'autolyse en phase stationnaire (GOEBEL et AVERY, 1929). La protéine responsable de ce mécanisme est l'amidase *N*-acetylmuramoyl-L-alanine LytA. Au niveau de la physiologie bactérienne, sa délétion induit l'absence d'autolyse en phase stationnaire et une tendance à former des chaînettes dans certaines souches (TOMASZ, ALBINO et ZANATI, 1970 ; SANCHEZ-PUELLES et al., 1986). (A noter que nous n'avons pas



**FIGURE 2.6** – Schéma des CBPs de *S. pneumoniae*. Les carrés violets représentent les CBMs, ceux représentés en orange et bleu clair présentent des séquences non canoniques. Les carrés annotés correspondent aux domaines catalytiques ou fonctionnels. CbpL possède des domaines Excalibur (Exc) et lipoprotéique (LP). \* structure tridimensionnelle complète résolue. Adapté de BROWN, HAMMERSCHMIDT et ORIHUELA, 2015.

observé la formation significative de chaînettes dans la souche R6  $\Delta$ lytA (PAGLIERO et al., 2008) utilisée au laboratoire.)

Considérée comme l'autolysine majeure de *S. pneumoniae*, LytA est impliquée dans de nombreux autres mécanismes. Au niveau de la physiologie cellulaire, elle participe à la lyse fratricide lors la compétence (ELDHOLM et al., 2009) détaillée page 43, et elle est responsable de la lyse induite par les antibiotiques ciblant la machinerie de synthèse du PG, comme la pénicilline (TOMASZ, ALBINO et ZANATI, 1970; TOMASZ et WAKS, 1975).

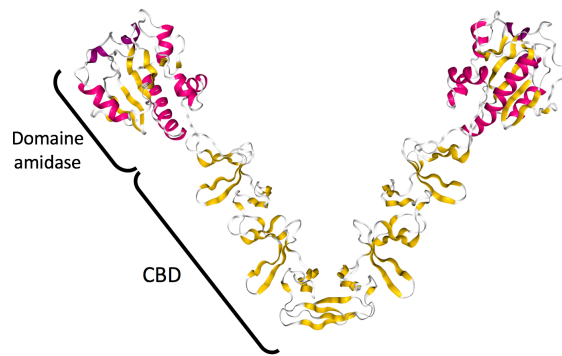
Des études chez la souris ont montré que des pneumocoques mutés pour LytA sont moins virulents que la souche sauvage (BERRY et al., 1989; BERRY et PATON, 2000; CANVIN et al., 1995; ORIHUELA et al., 2004; KHARAT et TOMASZ, 2006; HIRST et al., 2008). Ce rôle important est multi-factoriel dans la virulence et est lui-même lié aux différentes conséquences de l'autolyse qui contribuent au relargage de facteurs de virulence et à l'évasion du système immunitaire de l'hôte :

- Les fragments de paroi générés par l'action de LytA réduisent la phagocytose des bactéries (MARTNER et al., 2009). Plus récemment, il a été démontré que les bactéries vivantes induisent la transcription des gènes liés à la synthèse d'interféron alors qu'elle est inhibée par les fragments de bactéries autolysées (SKOVBJERG et al., 2017). LytA contribue aussi à l'inhibition de l'activation du système du complément (RAMOS-SEVILLANO et al., 2015). Ces résultats montrent que l'autolyse induite par LytA joue un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte afin de promouvoir la survie bactérienne.

- LytA contribue à la survie bactérienne en induisant la perte de la capsule polysaccharidique au contact des cellules épithéliales de l'hôte lors des phases initiales de l'infection, ce qui permet d'échapper au système immunitaire ciblant la capsule (KIETZMAN et al., 2016).

- LytA joue aussi un rôle dans la formation de biofilms. Elle contribue, avec d'autres CBPs (LytB, LytC, CbpA, PcpA et PspA), à la formation de biofilms, probablement par le relargage d'ADN extracellulaire et d'autres composants des biofilms (MOSCOSO, GARCIA et LOPEZ, 2006). D'autre part, il a été montré que LytA ainsi que les CBPs LytC, LytB, CbpE et PspC et CbpF interagissaient *in vitro*, indépendamment de leur CBD, avec l'ADN exogène, composant essentiel de la matrice des biofilms (DOMENECH et al., 2015).

Le gène codant pour LytA est très conservé et moins sujet aux mutations comparé à d'autres facteurs de virulence (WHATMORE et DOWSON, 1999). Pour ces raisons, il est utilisé comme un des gènes cibles dans le diagnostic clinique de *S. pneumoniae* (GREVE et MOLLER, 2012; SONG, EUN et NAHM, 2013).



**FIGURE 2.7 – Structure cristallographique d’un dimère de LytA chez la souche TIGR4 de *S. pneumoniae*.** LytA dimérise via la région terminale des CBDs de chacun des monomères. Source : LI et al., 2015.

• **Régulation :**

Du fait de son rôle autolytique et de la variété de mécanismes dans lesquels LytA est impliquée, son activité nécessite une régulation fine afin de prévenir et/ou réguler le mécanisme d’autolyse en fonction de l’environnement extracellulaire et du stade de l’infection. Différents niveaux de régulation ont été identifiés mais malgré les nombreuses études sur LytA, la régulation de son activité enzymatique au cours de la croissance reste peu comprise.

LytA se compose d’un domaine enzymatique amidase N-terminal qui catalyse le clivage des liaisons *N*-acetylmuramoyl-L-alanine du PG (MOSSER et TOMASZ, 1970 ; HOWARD et GOODER, 1974) et d’un CBD C-terminal composé d’une répétition de six CBMs présentant quatre sites qui se fixent de façon non covalente sur les PCho des TA (FERNÁNDEZ-TORNERO et al., 2001 ; FERNÁNDEZ-TORNERO et al., 2002) (Figure 2.7 page 39).

Les cellules en phase exponentielle sont protégées de l’action de LytA mais cette protection est perdue lorsque la machinerie de synthèse du peptidoglycane est stoppée, par l’absence de nutriment, en phase stationnaire ou par l’utilisation d’antibiotiques comme la pénicilline ciblant la machinerie de biosynthèse du PG (TOMASZ, ALBINO et ZANATI, 1970 ; MELLROTH et al., 2012). Il est à noter que LytA participe ainsi à l’effet bactéricide de ces antibiotiques (TOMASZ et WAKS, 1975).

Différents mécanismes contribuant à la protection du PG et à la régulation de LytA ont été identifiés :

- **Régulation spatiale.** LytA se localise principalement dans le cytoplasme lors de la phase exponentielle, la protéine est donc séquestrée dans ce compartiment et ne peut avoir accès au peptidoglycane à la surface cellulaire. Lorsque la culture



bactérienne atteint la phase stationnaire de croissance, la protéine est relarguée dans le milieu par un mécanisme inconnu et s'accumule à la surface des bactéries avant d'atteindre un seuil de concentration critique déclenchant la lyse des bactéries qui, par effet en cascade, induit la lyse de toutes les bactéries (MELLROTH et al., 2012). Ce modèle est illustré et expliqué figure 2.8 page 41.

Le mécanisme de relargage de LytA dans le milieu extracellulaire en début de phase stationnaire est encore mal connu. La protéine ne possède pas de peptide signal et ne peut donc pas être sécrétée par le système de sécrétion classique. Une des hypothèses actuelles seraient qu'un mécanisme de mort cellulaire programmée induirait une fragilisation de la membrane, permettant ainsi le relargage de protéines intracellulaires. Ce mécanisme serait initié par la production de peroxyde d'hydrogène par SpxB qui induirait la mort cellulaire en phase stationnaire et de ce fait le relargage de LytA conduisant à l'autolyse (REGEV-YOCHAY et al., 2007).

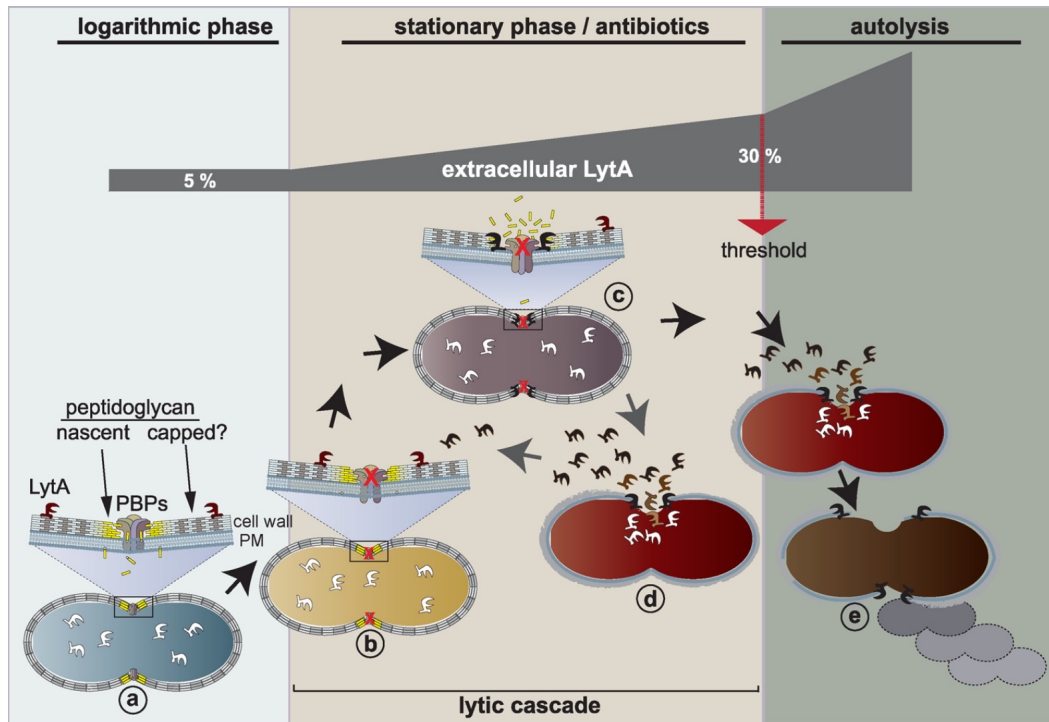
La pneumolysine est un important facteur de virulence du pneumocoque (BERRY et PATON, 2000; CANVIN et al., 1995; HIRST et al., 2008) responsable de la formation de pores dans la membrane des cellules eucaryotes en se fixant sur le cholestérol des membranes des cellules eucaryotes pour former des pores via son oligomérisation, ce qui induit la lyse des cellules hôtes (HIRST et al., 2004; MARSHALL et al., 2015). Comme LytA, la pneumolysine ne possède pas de peptide signal permettant sa sécrétion par le système de sécrétion classique et il a été supposé que son relargage dans le milieu cellulaire était dépendant de l'autolyse par LytA (MARTNER et al., 2008). Cependant, il a été montré par la suite que le relargage de la pneumolysine était indépendant de LytA (BALACHANDRAN et al., 2001) et que la pyruvate oxydase SpxB contribuait à son relargage indépendamment de l'autolyse (BRYANT et al., 2016).

Ainsi, la production de peroxyde d'hydrogène par SpxB fragilise les membranes et joue un rôle dans le relargage de la pneumolysine en phase exponentielle et de LytA en phase stationnaire.

De plus, il a de plus été récemment montré que le relargage de la pneumolysine serait dépendant du système de sécrétion accessoire SecY2A2 (BANDARA et al., 2017). Le relargage de LytA via ce système n'a pas été étudié.

## - Régulation de l'activité de LytA.

- **Au niveau de la protéine.** Les structures cristallographiques du CBD (FERNÁNDEZ-TORNERO et al., 2001; FERNÁNDEZ-TORNERO et al., 2002), du domaine catalytique (MELLROTH et al., 2014) seul ou en complexe avec un substrat synthétique de PG (SANDALOVA et al., 2016) et de la protéine complète (LI et al.,



**FIGURE 2.8 – Modèle actuel du déclenchement de l'autolyse induite par LytA chez *S. pneumoniae*.** a. Durant la phase exponentielle de croissance (logarithmic phase) LytA est essentiellement localisée dans le cytoplasme. Seulement 5% de la quantité totale produite de LytA est associée aux TA. Les hypothèses émises par les auteurs sont que l'activité de LytA est inhibée au site de synthèse lorsque la machinerie de biosynthèse du PG fonctionne, et que le PG mature posséderait une protection empêchant l'activité autolytique de LytA. b. L'arrêt de la machinerie de synthèse du PG lorsque les cellules entrent en phase stationnaire ou par l'utilisation d'un antibiotique ciblant cette machinerie, rendrait le PG néosynthétisé susceptible à l'action de LytA (c). L'activité hydrolytique de LytA induirait la lyse des cellules, libérant ainsi la protéine LytA cytoplasmique des cellules lysées, qui à son tour se fixe sur les cellules voisines en induisant leur lyse. Cette cascade lytique induirait une accumulation de LytA extracellulaire jusqu'à atteindre une concentration critique estimée à 30% du LytA total soit environ  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  déclenchant le mécanisme d'autolyse de l'ensemble de la population bactérienne. Source : MELLROTH et al., 2012.

2015) ont été résolues (Figure 2.7 page 39). La nécessité de la choline pour l'activité autolytique de LytA avait été mise en évidence dans plusieurs études (MOSSER et TOMASZ, 1970; GARCÍA et al., 1985; SANZ, LOPEZ et GARCIA, 1988) et les données structurales et biochimiques plus récentes ont permis de montrer que la dimérisation via le CBD et l'occupation de tous les sites liant la choline permettaient à LytA d'adopter une conformation entièrement active afin de cliver les liaisons lactylamides du PG (ROMERO, LÓPEZ et GARCÍA, 2007; LI et al., 2015). Ainsi, LytA résiderait dans le cytoplasme sous forme inactive pendant la phase exponentielle et deviendrait active en contact de la paroi lors de sa fixation au PCho des TA et de sa dimérisation.

L'analyse du phosphoprotéome de *S. pneumoniae* indique que LytA est phosphorylée (SUN et al., 2010). Une autre étude a montré que cette phosphorylation serait réalisée par la tyrosine kinase CpsD et la déphosphorylation par CpsB, deux protéines codées par des gènes appartenant à l'opéron de synthèse de la capsule. La phosphorylation de LytA augmenterait son affinité pour la fixation sur la choline, sa capacité de dimérisation et son activité (STANDISH, WHITTALL et MORONA, 2014).

- **Au niveau de la reconnaissance du substrat.** Il a été montré que l'activité enzymatique est aussi régulée au niveau de la reconnaissance du substrat. Le substrat de LytA se situerait au niveau du site de néosynthèse du PG. Ce substrat serait le PG néosynthétisé mais ce dernier serait protégé de LytA lorsque la machinerie de synthèse est active puisque les cellules deviennent sensibles à la lyse par LytA uniquement lors de l'arrêt de la synthèse. La machinerie de synthèse du PG contrôlerait donc l'activité de LytA en séquestrant le PG (MELLROTH et al., 2012).

Une étude biochimique, ainsi que la résolution de la structure du site catalytique en complexe avec un substrat synthétique, montre que LytA ne peut couper qu'un fragment de PG composé de plus de deux saccharides alternant des résidus *N*-acetyl glucosamine et *N*-acetyl muramique liés à un brin peptidique (MELLROTH et al., 2014). De plus, la structure de ce ligand change de conformation lors de la liaison avec le domaine amidase de LytA qui lui n'est pas modifié (SANDALOVA et al., 2016). Un tel épitope du PG avec une conformation similaire serait donc présent au site de néosynthèse du PG mais son accès pour LytA serait régulé par la machinerie de biosynthèse (MELLROTH et al., 2014). Cette hypothèse est aussi supportée par le fait qu'un mutant déplété pour PBP2b, une protéine de synthèse du PG, est sensible à LytA en phase exponentielle de croissance (BERG et al., 2013).

D'autre part, la localisation à la surface bactérienne de la protéine LytA recombinante fusionnée à la GFP (DE LAS RIVAS et al., 2002) ou marquée avec un fluorophore (MELLROTH et al., 2012) montre que LytA se fixe au niveau du site de division, ce qui conforte l'hypothèse d'un mécanisme de régulation ayant lieu uniquement au site de division. Les première et deuxième publications présentées dans ce manuscrit apportent des éléments de réponses supplémentaires dans la compréhension de ce mécanisme de protection en phase exponentielle de croissance.

#### **2.1.4.2 Rôle de LytA, CbpD et LytC (et CbpF) dans la lyse fratricide induite par les cellules compétentes au cours de la transformation bactérienne**

La transformation bactérienne naturelle, mécanisme permettant à une bactérie d'intégrer de l'ADN exogène, a été découverte chez *S. pneumoniae* (GRIFFITH, 1928 ; AVERY, MACLEOD et MCCARTY, 1944). La compétence pour la transformation génétique est l'état physiologique durant lequel la bactérie est capable d'internaliser de l'ADN exogène et de l'intégrer dans son génome par recombinaison homologue (revue : CLAVERYS et al., 2009). Ce mécanisme est illustré par la figure 2.9 page 44 et expliqué ci-après :

L'induction de la compétence pourrait être due en partie à des signaux environnementaux lors de la formation de biofilms mais ce mécanisme reste encore mal compris. L'état de compétence implique l'expression transitoire des gènes précoces et tardifs de la compétence (CLAVERYS, MARTIN et HÅVARSTEIN, 2007 ; JOHNSBORG et al., 2008). Deux opérons sont d'abord activés, *comAB* qui code pour un ABC (ATP-Binding-Cassette) transporteur (CHANDLER et MORRISON, 1987) et *comCDE* qui code pour le peptide de stimulation de la compétence (CSP) sous forme inactive (HÅVARSTEIN, COOMARASWAMY et MORRISON, 1995), ComC/ComD le récepteur de CSP et ComE le régulateur de réponse du système à deux composantes ComDE (HÅVARSTEIN et al., 1996). Le transporteur ComAB active la forme mature de CSP et le sécrète (étape 1). Au niveau de la membrane, CSP peut ainsi se fixer sur ComD qui phosphoryle ComE (étape 2). La phosphorylation de ComE induit sa fixation sur le promoteur et l'induction de l'expression d'une vingtaine de gènes précoces de la compétence (étape 3). L'expression de ComX active l'expression de 80 gènes tardifs de la compétence dont la machinerie d'import et de recombinaison de l'ADN exogène (étape 4). La machinerie d'import implique la formation d'un pilus de type IV exprimé au niveau du septum qui se lie à l'ADN double brin exogène (LAURENCEAU et al., 2013). Cet ADN serait ensuite transféré au récepteur ComEA puis dégradé en ADN simple brin par l'endonucléase EndA du côté extracellulaire (LACKS et NEU-

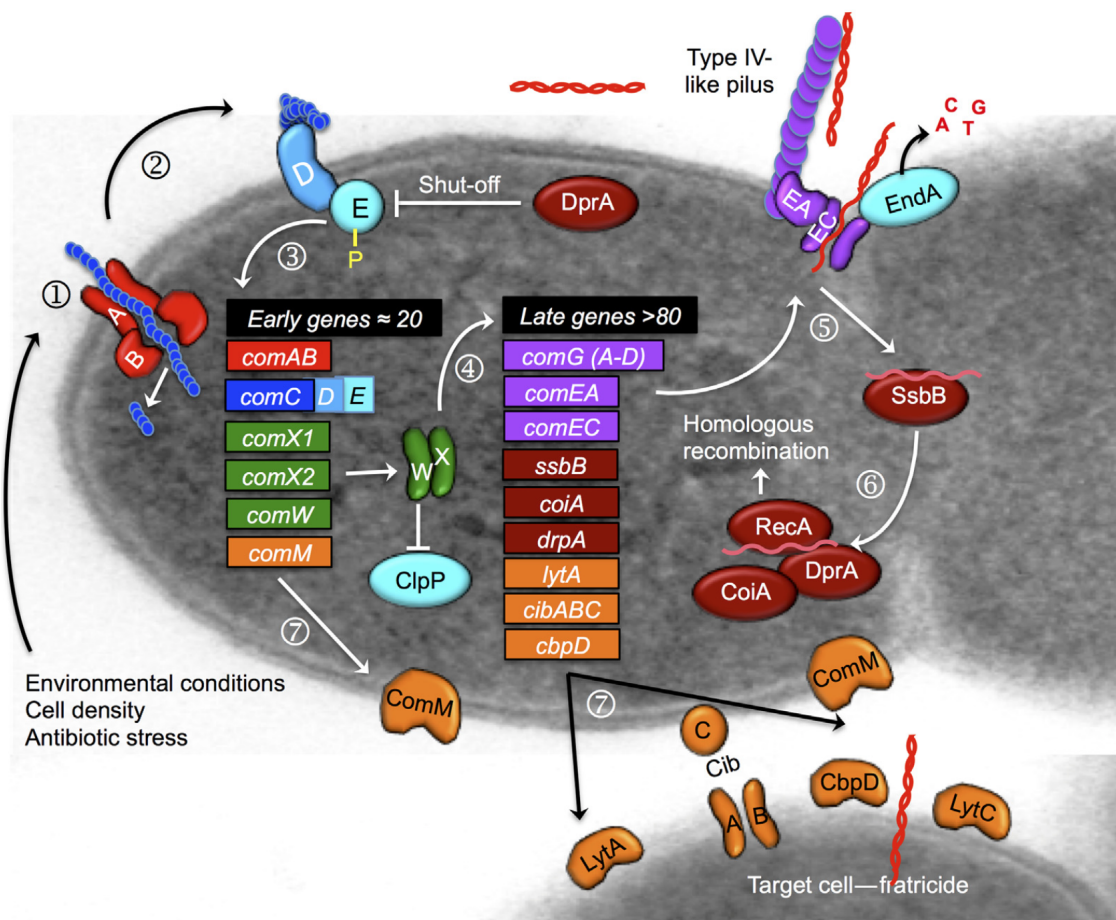


FIGURE 2.9 – Schéma des mécanismes de compétence et fratricide chez *S. pneumoniae*. Source :BROWN, HAMMERSCHMIDT et ORIHUELA, 2015.

BERGER, 1975 ; BERGÉ et al., 2013). L'ADN est importé par le pore ComEC (étape 5). Une fois dans le cytoplasme, il se fixe aux protéines de fixation SsbA et SsbB qui protège aussi l'ADN de la dégradation (ATTAIECH et al., 2011 ; SALERNO, ANNE et BRYANT, 2011). La machinerie de recombinaison entre alors en jeu pour intégrer l'ADN dans le chromosome bactérien. La recombinase RecA, chargée en ADN par DprA (MORTIER-BARRIÈRE et al., 2007), intègre cet ADN dans le chromosome par recombinaison homologue avec l'aide de CoiA et la protéine de réparation de l'ADN RadA (BURGHOUT et al., 2007 ; DESAI et MORRISON, 2006) (étape 6). Il a récemment été montré que les protéines ComFA et ComFC qui interviendraient entre l'étape d'intégration de l'ADN et la recombinaison homologue sont aussi essentielles à la transformation : ComFA possède une activité ATPase et interagit avec l'ADN simple brin, et également avec ComFC et DprA (DIALLO et al., 2017).

L'état de compétence de *S. pneumoniae* est caractérisé d'une part, par le mécanisme de transformation durant lequel la bactérie importe et intègre de l'ADN exogène, et d'autre part par le mécanisme de lyse fratricide durant lequel les pneumocoques compétents peuvent acquérir de l'ADN en tuant les pneumocoques non compétents (STEINMOEN, KNUTSEN et HÅVARSTEIN, 2002 ; GUIRAL et al., 2005 ; CLAVERY et HÅVARSTEIN, 2007) (étape 7) et des bactéries d'espèces proches comme *S. mitis* et *S. oralis* (JOHNSBORG et al., 2008).

Le fratricide participe aussi lors de l'infection en relarguant des facteurs de virulence et des médiateurs de l'inflammation. Trois CBPs : CbpD, LytC et LytA sont impliquées dans ce mécanisme afin de lyser les pneumocoques non compétents ainsi que les bactéries d'espèces proches (JOHNSBORG et al., 2008).

- La muréine hydrolase CbpD, uniquement exprimée durant la compétence, est la seule à être essentielle pour la lyse des cellules non-compétentes (KAUSMALLY et al., 2005 ; GUIRAL et al., 2005). CbpD possède un domaine N-terminal CHAP (Cystéine,Histidine-Dépendante Amidohydrolase/Peptidase) N-terminal responsable du clivage du PG, deux modules SH3b qui se fixent sur le PG et un CBD qui se fixe sur les TA et localise CbpD au site de division (ELDHOLM et al., 2010). Le domaine CHAP est essentiel à l'activité de CbpD dans la lyse fratricide (HÅVARSTEIN et al., 2006) et nécessaire à l'activation de LytC (ELDHOLM et al., 2010). En culture liquide, CbpD seule induit peu de lyse des cellules cibles, mais son effet est multiplié par sept lors de son activation par LytA et LytC (ELDHOLM et al., 2009). Les cellules sont en fait attaquées en premier par CbpD qui se fixe et clive le PG au site de division et les dommages causés au PG rendrait le substrat accessible à l'action de LytC (PÉREZ-DORADO et al., 2010) et LytA.

- Le lysozyme LytC est constitutivement exprimé et présent en quantité assez

importante dans le milieu de culture de cellules non compétentes sans induire de lyse (ELDHOLM et al., 2009). LytC possède un CBD N-terminal et un domaine catalytique C-terminal qui présente une orientation atypique en direction du CBD (LÓPEZ et al., 2000; MONTERROSO et al., 2005; PÉREZ-DORADO et al., 2010). C'est cette conformation en forme de crochet qui expliquerait que LytC est capable de couper du PG uniquement après clivage par CbpD, ce qui faciliterait ainsi son accès aux chaînes de PG non réticulées.

De plus, il a été montré que CbpF, l'une des protéines les plus abondantes de la paroi du pneumocoque, participe à la régulation de LytC par l'inhibition de son activité lytique (MOLINA et al., 2009).

- L'amidase LytA constitutivement exprimé est surexprimée lors de l'induction de la compétence. Son activité, sa structure et ses autres fonctions ont précédemment été détaillées page 36.

Les cellules compétentes expriment aussi la protéine précoce de la compétence ComM, une protéine membranaire intégrale qui protège de la lyse fratricide (HÅVARSTEIN et al., 2006). Le mécanisme par lequel ComM confère une immunité aux cellules est inconnu. Il a récemment été montré qu'une quantité trop élevée de ComM devient délétaire pour les cellules et que la protéase RseP régule son niveau d'expression (STRAUME et al., 2017). Enfin d'autres protéines sont exprimées par les cellules compétentes, les protéines bactériocines-like CibAB qui participent au fratricide et CibC qui protège aussi les cellules de la lyse (GUIRAL et al., 2005).

Ces mécanismes de transformation, compétence et lyse fratricide promeuvent ainsi le transfert horizontal de gènes et la plasticité du génome de *S. pneumoniae* (revues : JOHNSBORG, ELDHOLM et HÅVARSTEIN, 2007; JOHNSTON et al., 2014a) qui représentent des acteurs importants de l'évolution. Le transfert horizontal de gènes facilite et accélère le fitness des pneumocoques pour la colonisation et contribue à leur adaptation aux stress environnementaux ce qui leur permet en particulier, d'échapper aux vaccins, par le mécanisme de remplacement sérotypique, et aux défenses immunitaires de l'hôte, et contribue également à la transmission rapide des gènes de résistances aux antibiotiques (COFFEY et al., 1991; DONKOR et al., 2011; JOHNSTON et al., 2014b).

### 2.1.4.3 Les autres CBPs

**LytB** est une *N*-acetylglucosaminidase non autolytique qui participe à la séparation des cellules filles. Sa délétion induit la formation de longues chaînes de bactéries (GARCIA et al., 1999; LÓPEZ et al., 2000). La double délétion *lytA lytB* montre un

phénotype un peu plus prononcé qui suggère que LytA contribuerait de façon modérée à ce mécanisme (SANCHEZ-PUELLES et al., 1986). Il a été confirmé *in vitro* que l'activité de LytB sur la dégradation du peptidoglycane est quatre fois plus élevée après dégradation des liaisons amides par LytA ce qui faciliterait l'accès au peptidoglycane et donc l'activité enzymatique de LytB (RICO-LASTRES et al., 2015). Le rôle de LytB est aussi validé par la localisation polaire de la fusion recombinante GFP-LytB (DE LAS RIVAS et al., 2002). Cette localisation est dépendante du CBD de LytB qui se fixe sur les TA, mais indépendante de la présence de choline puisque la même localisation est observée lors de son remplacement par d'autres amino alcools. Par contre, l'activité de séparation des cellules est dépendante de la présence de choline (RICO-LASTRES et al., 2015). L'étude structurale de LytB couplée à des expériences *in vitro* montrent que la faible activité de LytB s'explique par le fait que la protéine clive uniquement les liaisons glucosidiques GlcNAc- $\beta$ -(1,4)-MurNAc dont le GlcNAc est N-acétylé, avec une préférence pour les mucopeptides non réticulés (RICO-LASTRES et al., 2015 ; BAI et al., 2014).

D'autre part, LytB joue un rôle important dans la virulence. Elle participe à la formation de biofilm (MOSCOSO, GARCIA et LOPEZ, 2006 ; DOMENECH et al., 2015), à l'attachement aux cellules épithéliales humaines (RODRIGUEZ, DALIA et WEISER, 2012 ; BAI et al., 2014) et au développement de la septicémie et la pneumonie en contribuant avec LytC à échapper au système du complément et à la phagocytose (RAMOS-SEVILLANO et al., 2011). Cette protéine est donc une cible intéressante pour le développement de vaccin. L'immunisation avec un sérum anti-LytB protège significativement les souris contre différentes souches du pneumocoque (WIZEMANN et al., 2001) et l'immunisation avec la protéine LytB augmente la clairance bactérienne et protège contre la septicémie et la pneumonie invasive (CORSINI et al., 2016).

**CbpE** (ou Pce) est une estérase qui clive environ 30% des PChos des TA (HÖLTJE et TOMASZ, 1974 ; DE LAS RIVAS et al., 2002 ; VOLLMER et TOMASZ, 2001). Sa délétion induit un changement de morphologie des colonies et une augmentation de la virulence chez la souris (VOLLMER et TOMASZ, 2001). Les structures du domaine catalytique et de la protéine entière ont été déterminées (GARAU et al., 2005 ; HERMOSO et al., 2005 ; LAGARTERA et al., 2005). CbpE cliverait de façon préférentielle les résidus PCho situés à l'extrémité des TA, ceux probablement impliqués dans les interactions avec l'hôte, et maintiendrait ceux nécessaires pour la fixation des autres CBPs (HERMOSO et al., 2005). Les résidus PCho interagissant avec la CRP (protéine C-réactive) (VOLANAKIS et KAPLAN, 1971), leur relargage permettrait donc



d'échapper au système immunitaire. Les PChos se fixent aussi sur le récepteur du facteur d'activation plaquettaire (PAF), qui possède aussi des résidus PCho, ce qui contribue à l'invasion (CUNDELL et al., 1995). CpbE est également capable d'hydrolyser le PAF (HERMOSO et al., 2005) ce qui réduit l'activation des neutrophiles, réduit l'inflammation et contribue à la persistance bactérienne au niveau des muqueuses (HERGOTT et al., 2015). Le domaine esterase de CbpE interagit aussi avec le plasminogène, le précurseur de la plasmine. Cette interaction contribuerait à l'invasion tissulaire par le clivage des jonctions intercellulaires et migration au travers de la matrice extracellulaire (ATTALI et al., 2008). Par ses différentes fonctions CbpE participe donc à la régulation fine de la décoration en PCho des TA, à la colonisation de l'hôte ainsi qu'à l'évasion face au système immunitaire.

**Autres CBPs.** D'autres CBPs jouent des rôles importants en particulier dans la virulence, même si leur mécanisme d'action reste encore peu compris (ROSENOW et al., 1997; BERGMANN et HAMMERSCHMIDT, 2006; GOSINK et al., 2000; HAKENBECK et al., 2009; FROLET et al., 2010).

PspA (Pneumococcal surface protein A), CbpA et CbpG ont un rôle dans l'interaction avec les cellules hôtes (MANN et al., 2006; OGUNNIYI et al., 2007; VOSS et al., 2013). PspA est l'une des protéines les plus abondantes à la surface de *S. pneumoniae*. Elle est impliquée dans plusieurs mécanismes de virulence de la bactérie et prévient notamment la fixation du complément à la surface bactérienne par l'inhibition de la fixation de la CRP en générant une compétition pour la fixation aux résidus PCho des TA (MUKERJI et al., 2012). Cela en fait un candidat intéressant dans le développement de vaccins ciblant tous les sérotypes de pneumocoques (revue : KHAN et JAN, 2017).

CbpA (PspC) est une des adhésines majeures du pneumocoque et aussi un candidat intéressant pour le développement de vaccins (ROSENOW et al., 1997; VOSS et al., 2013).

CbpG serait une sérine protéase et une adhésine impliquée dans la virulence du pneumocoque (GOSINK et al., 2000; MANN et al., 2006).

Enfin, CbpI, CbpJ, CbpK, CbpL, CbpN et CbpM seraient des adhésines mais leur mécanisme d'action reste encore peu connu (FROLET et al., 2010).

Pour conclure, les CBPs possèdent des rôles variés est très importants pour la physiologie bactérienne et la pathogenèse. Elles sont de ce fait des cibles intéressantes pour le développement de médicaments anti-pneumocoques qui pourraient avoir un double rôle en ciblant l'inhibition de leur fixation sur les TA et en les utilisant comme

agent lytique (enzybiotique) pour celles ayant une activité lytique (MAESTRO et SANZ, 2016).

## 2.2 Peptidoglycane

### 2.2.1 Rôle

Le peptidoglycane est un composant essentiel de la paroi des bactéries dont la fonction principale est de prévenir la lyse osmotique de la cellule en maintenant la pression osmotique interne. Il est impliqué dans les mécanismes de croissance et division et détermine la forme et la taille de la bactérie. Il sert aussi de barrière contre les menaces extérieures, est impliqué dans la réponse au système immunitaire inné et fonctionne comme un échafaudage pour le support de composants cellulaires qui interagissent avec l'environnement. Il supporte ainsi des polymères comme les acides téichoïques ou encore la capsule polysaccharidique et de nombreuses protéines.

Les protéines attachées covalamment au peptidoglycane possèdent un peptide signal en N-terminal et sont attachées par une sortase qui reconnaît le motif LPxTG (dont x est une acide aminé quelconque) localisé à l'extrémité C-terminale (revues : DRAMSI et al., 2008 ; LÖFLING et al., 2011 ; SCHNEEWIND et MISSIAKAS, 2012). Les souches de pneumocoque possèdent jusqu'à 18 protéines possédant ce motif. Parmi elles, on trouve les trois pilines composant les pili, structures filamentaires qui interagissent avec la matrice extracellulaire et qui sont impliquées dans l'adhésion à la cellule hôte et dans les processus de virulence de façon générale (pour revue chez les bactéries à Gram positif : KHARE et V. L. NARAYANA, 2017, et chez le pneumocoque BROWN, HAMMERSCHMIDT et ORIHUELA, 2015 chapitre 17). La publication présentée en annexe de ce manuscrit présente un outils moléculaire développé au laboratoire, basé sur l'étude structurale de la piline RrgA et ayant diverses applications biotechnologiques.

Les protéines attachées non covalamment possèdent des modules de fixation comme les domaines LysM (Lysine Motif). De nombreuses hydrolases du peptidoglycane possèdent ce domaine chez d'autres bactéries (revue : BUIST et al., 2008). Chez *Streptococcus pneumoniae* les protéines qui possèdent ce domaine seraient impliquées dans le métabolisme de la paroi (GIEFING-KROLL et al., 2011).

### 2.2.2 Composition - Synthèse

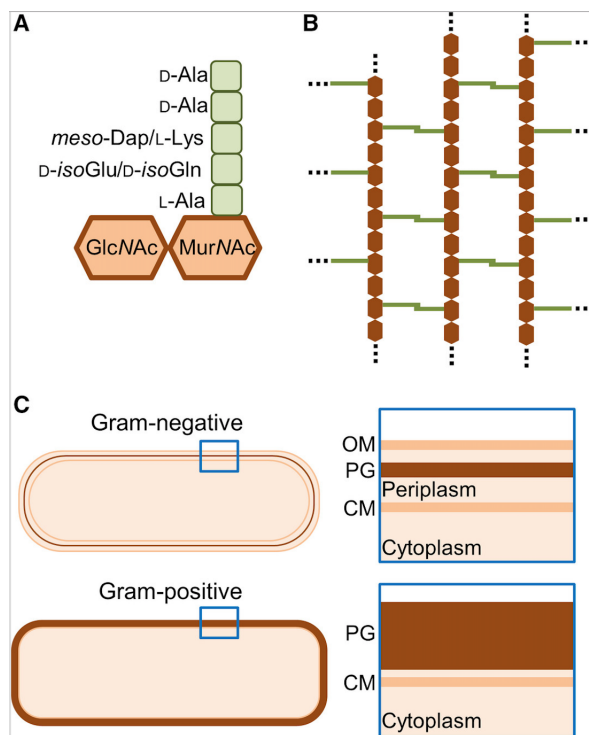
Le peptidoglycane (PG) est une macromolécule qui entoure la membrane cellulaire formant un réseau robuste qui permet de résister à la pression osmotique

interne et confère la forme bactérienne (VOLLMER, BLANOT et DE PEDRO, 2008). Il est composé de chaînes glycanes alternant des résidus de *N*-acetylglucosamine et acides *N*-acetylmuramique, et reliées par des ponts peptidiques (SCHLEIFER et KANDLER, 1972) (Figure 2.10A et B page 51). Bien que la composition du PG soit globalement très conservée, des variations au niveau des acides aminés formant les branches peptidiques (Figure 2.10A) et des modifications chimiques des chaînes glycanes, comme la *N*-déacétylation ou la *O*-acétylation, apportent une grande diversité dans la structure et l'architecture du PG (SCHLEIFER et KANDLER, 1972; VOLLMER et al., 2008; VOLLMER, 2008).

Le remodelage du PG est accru par l'aspect dynamique de son métabolisme. En effet, le PG est continuellement renouvelé et sa structure est adaptée aux facteurs environnementaux et aux conditions de croissance et d'âge des cellules.

Chez les bactéries à Gram négatif, le PG est fin (3 à 6 nm de d'épaisseur) et se situe entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe. Chez les bactéries à Gram positif, le PG est plus épais (10 à 40 nm d'épaisseur), se situe au-dessus de la membrane plasmique, en contact direct avec le milieu extracellulaire, et permet l'ancrage d'autres polysaccharides tels que les acides téichoïques et la capsule polysaccharidique ainsi que les protéines de type LPxTG (Figure 2.10C page 51) (TURNER, VOLLMER et FOSTER, 2014; VOLLMER et SELIGMAN, 2010; SIEGEL, LIU et TON-THAT, 2016).

Un schéma de la biosynthèse du PG est présenté page 53 et expliqué ci-après. La synthèse du peptidoglycane débute par la synthèse du précurseur lipidique dans le cytoplasme (BARRETEAU et al., 2008; BOUHSS et al., 2008). La synthèse de l'UDP-GlcNAc et de l'UDP-MurNAc est catalysée par GlmU, MurA et MurB. Les D-Ala sont synthétisés par Alr, les D-Glu par MurI et les dipeptides D-Ala-D-Ala par la ligase Ddl. Le pentapeptide L-Ala-( $\gamma$ )D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala est ajouté sur l'UDP-MurNAc par MurC-MurF et l'UDP-MurNac pentapeptide est ensuite transféré sur un undecaprenyl phosphate, porteur lipidique lié à la membrane, par MraY pour former un undecaprenyl pyrophosphoryl-MurNAc pentapeptide nommé lipide I. Le lipide I est converti en lipide II par le transfert d'un résidu GlcNAc à partir de l'UDP-GlcNAc par MurG. La plupart des D-Glu sont amidés par MurT/GatD en D-Gln (GARCIA-BUSTOS, CHAIT et TOMASZ, 1987; BUI et al., 2012). Les peptides peuvent aussi être branchés par MurM/MurN avec un dipeptide L-Ser-L-Ala ou L-Ala-L-Ala lié à la lysine, cette modification est particulièrement présente chez certaines souches résistantes aux  $\beta$ -lactamines (FILIPE et TOMASZ, 2000; SEVERIN



**FIGURE 2.10 – Représentation schématique du PG chez les bactéries à Gram positif et négatif.** **A.** L'unité de base du PG est composée d'un disaccharide *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) et acide *N*-acetylmuramique (MurNAc) avec un peptide branché sur le MurNAc dont la composition varie chez les bactéries à Gram négatif/positif. **B.** Représentation simplifiée du maillage du peptidoglycane formé de chaînes glycanes reliées par des ponts peptidiques. **C.** Schéma simplifiée de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram négatif ou positif. Illustration de EGAN et al., 2016.

et TOMASZ, 1996). Les peptides branchés contribuent aussi à la virulence du pneumocoque en régulant le relargage de la pneumolysine (GREENE et al., 2015). Le lipide II est ensuite transloqué à travers la membrane par FtsW/RodA (MOHAMMADI et al., 2011).

Les étapes finales de polymérisation du PG sont réalisées dans le périplasme (l'espace extracellulaire chez les bactéries à Gram positif) par les Protéines Liant la Pénicilline (PLPs ou PBPs pour Penicillin Binding Proteins ) à partir du lipide II. Ces protéines se nomment ainsi car elles sont la cible des antibiotiques  $\beta$ -lactamines dont la pénicilline (SAUVAGE et al., 2008 ; SAUVAGE et TERRAK, 2016). Elles sont ancrées à la membrane plasmique par une région transmembranaire proche du N terminus et les domaines catalytiques sont exposés dans l'espace extracellulaire.

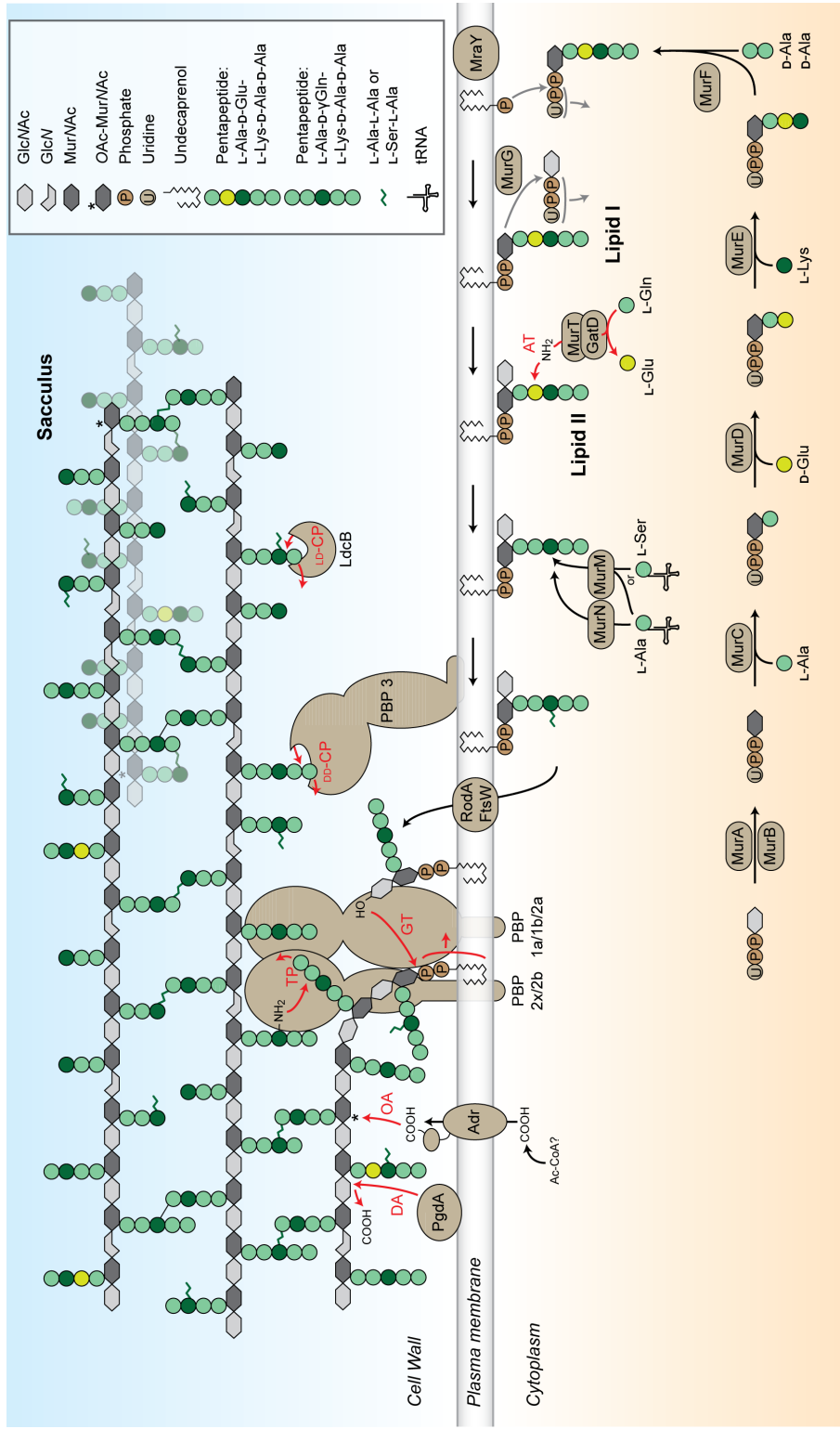
Les PBPs sont réparties en différentes classes.

- Les PBPs de classe A sont à la fois capables de polymériser les chaînes glycanes via leur domaine glycosyltransférase et de réticuler les peptides via leur domaine transpeptidase (DI GUILMI et al., 2002 ; MACHEBOEUF et al., 2005). La plupart des espèces bactériennes requiert au moins une PBP de classe A pour croître (SAUVAGE et al., 2008). C'est le cas par exemple de *E. coli* chez laquelle la délétion de deux de ses trois PBPs de classe A est létale (YOUSIF, BROOME-SMITH et SPRATT, 1985).

Cependant, il existe des bactéries à Gram positif comme *Bacillus subtilis* et *Enterococcus faecalis* capables de croître en l'absence de toutes leurs PBPs de classe A (ARBELOA et al., 2004 ; POPHAM et SETLOW, 1996). Il a été récemment montré chez *B. subtilis* que RodA, protéine appartenant à la famille des SEDS (Shape, Elongation, division and Sporulation) et identifiée comme translocase du lipide II, a aussi une activité glycolyltransférase (MEESKE et al., 2016 ; EMAMI et al., 2017). Une étude chez *E. coli* montre que la synthèse du PG serait réalisée par ces deux systèmes distincts de polymérasas : les protéines SEDS fonctionneraient avec le système du cytosquelette alors que les PBPs de classe A interviendraient indépendamment de ces complexes (CHO et al., 2016).

- Les PBPs de classe B possèdent uniquement un domaine catalytique transpeptidase et un domaine non catalytique dont la fonction serait de servir de socle pour le positionnement du domaine catalytique et participerait aux interactions protéines-protéines (PARES et al., 1996 ; GORDON et al., 2000 ; BERG, STRAUME et HAVARSTEIN, 2014 ; MACHEBOEUF et al., 2006).

Les PBPs de classe A chez *S. pneumoniae*, PBP1a, PBP1b et PBP2a, ne sont pas essentielles mais la double délétion de PBP1a et PBP2a est létale (PAIK et



**FIGURE 2.1.1 – Modèle de biosynthèse du PG chez *S. pneumoniae*.** Le précurseur lipide II est synthétisé dans le cytoplasme, transloqué à travers la membrane plasmique et incorporé dans le peptidoglycane. Les chaînes glycanes et les liaisons peptidiques subissent différentes modifications. En rouge : AT : activité amidotransférase, GT : activité glycosyltransférase, TP : activité glycosyltransférase, CP : activité carboxypeptidase, DA : déacétylation, OA : O- acétylation. Les protéines ne sont pas représentées à l'échelle. Schéma de PHILIPPE, 2014.

al., 1999). Ces protéines ne sont capables de réticuler que le lipide II amidé par MurT/GatD, un complexe essentiel pour la synthèse du PG (LIU et al., 2017). En référence aux travaux récents montrant que les protéines de la famille des SEDS ont aussi une activité glycosyltransférase (MEESKE et al., 2016), chez *S. pneumoniae* FtsW et RodA pourraient donc aussi posséder cette fonction en plus de leur activité de translocation du lipide II à travers la membrane. Les PBPs de classe B, PBP2x et PBP2b sont essentielles et sont responsables respectivement de la synthèse septale et périphérique du PG (BERG et al., 2013; PETERS et al., 2014). Ainsi, la délétion de PBP2x induit la formation de cellules allongées en forme de citron et celle de PBP2b, des cellules courtes en forme de lentilles (BERG et al., 2013).

En ce qui concerne la structure plus globale du PG, l'analyse de la composition du PG de *S. pneumoniae* a révélé qu'il contient des chaînes glycanes plus longues (plus d'environ 25 unités disaccharidiques) que celles d'*E. coli* et *S. aureus* (BUI et al., 2012).

### 2.2.3 Mode d'action des $\beta$ -lactamines et résistance

Le peptidoglycane étant essentiel et sa voie de biosynthèse très conservée chez les bactéries, sa synthèse est la cible de nombreux antibiotiques dont les  $\beta$ -lactamines (BROWN, HAMMERSCHMIDT et ORIHUELA, 2015). Les antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines ont une similarité structurale avec les résidus D-Ala utilisés comme substrat par la réaction de transpeptidation par les PBPs mais présentent néanmoins des spécificités différentes envers les PBPs (KOCAOGLU et al., 2015). Les molécules  $\beta$ -lactamines se fixent covalamment au site catalytique des domaines transpeptidase inhibant de manière irréversible l'activité transpeptidase (ZAPUN, CONTRERAS-MARTEL et VERNET, 2008). Cette inhibition induit l'arrêt de la croissance ( $\beta$ -lactamine bactériostatique) ou la lyse bactérienne ( $\beta$ -lactamine bactériolytique). L'effet bactériolytique induit par exemple par la pénicilline est dû à l'action de l'autolysine LytA (TOMASZ, ALBINO et ZANATI, 1970; SANCHEZ-PUELLES et al., 1986; MELLROTH et al., 2012). En phase exponentielle de croissance, les pneumocoques sont résistants à la lyse par LytA, l'action bactériolytique de la pénicilline serait due à l'arrêt de la machinerie de synthèse du PG qui le rend sensible à l'activité amidase de LytA (le mécanisme par lequel LytA serait exportée à la surface reste inconnu). Cependant, le mécanisme de sensibilité est vraisemblablement plus complexe puisqu'il est dépendant de la PBP inhibée. En effet, chez *S. pneumoniae*, les  $\beta$ -lactamines qui inhibent PBP2b ont un effet lytique alors que ceux qui n'interagissent pas avec cette protéine, comme les céphalosporines, ne le sont pas (HAKENBECK, TORNETTE et ADKINSON, 1987). De manière intéressante, la déplé-

tion de PBP2b rend aussi les pneumocoques en phase exponentielle de croissance sensibles à la lyse par LytA (BERG et al., 2013).

Cinq mécanismes majeurs ont été identifiés dans la résistance aux  $\beta$ -lactamines. Deux sont spécifiques aux bactéries à Gram négatif : la réduction de la perméabilité de la membrane externe et l'export de l'antibiotique à partir du périplasme. Les autres mécanismes, communs aux bactéries à Gram positif et négatif, sont la dégradation de l'antibiotique par des  $\beta$ -lactamases, l'utilisation de L,D transpeptidases au lieu de D,D transpeptidases, et la réduction de l'affinité des PBPs pour les  $\beta$ -lactamines qui est le principal mécanisme de résistance chez *S. pneumoniae*. Dans ce cas, l'apparition du phénotype de résistance se fait par acquisition de gènes de *pbp* codants pour des PBPs ayant une affinité diminuée pour ces  $\beta$ -lactamines. Chez le pneumocoque, PBP2b et PBP2x sont les principaux déterminants de la résistance aux  $\beta$ -lactamines (GREBE et HAKENBECK, 1996; MOUZ et al., 1999; PAGLIERO et al., 2004; CARAPITO et al., 2006; ZAPUN, CONTRERAS-MARTEL et VERNET, 2008; PHILIPPE et al., 2015).

Des variants de PBP2a ont été détectés dans des isolats cliniques (SMITH et KLUGMAN, 2005; FANI et al., 2014), mais aucuns de PBP1b et PBP3 (HAKENBECK et al., 2012) bien que des variants de PBP3 résistants à la céfotaxime aient pu être sélectionnés en laboratoire (KRAUSS et HAKENBECK, 1997). Malgré le fait qu'elles confèrent une résistance, ces variations impactent le fitness de la bactérie. Les variants de PBP2b induisent un temps de génération plus long et des défauts morphologiques, ces phénotypes sont par ailleurs compensés par la présence d'allèles résistants *pbp1a* et *pbp2x* (ALBARRACÍN ORIO et al., 2011). Enfin, des souches possédant plusieurs PBPs modifiées sont résistantes à un plus large spectre de  $\beta$ -lactamines (ALBARRACÍN ORIO et al., 2011).

Un autre mécanisme impliqué dans la résistance à la pénicilline a été identifié chez *S. pneumoniae* mais les mécanismes moléculaires restent incompris. Il s'agit de la O-acétylation du peptidoglycane par Adr (CRISOSTOMO et al., 2006), décrit page 60. Cette modification est étudiée dans la première publication présentée dans ce manuscrit.

## 2.2.4 Maturation et remodelage

Malgré la rigidité du réseau macromoléculaire, le PG est un polymère très dynamique qui nécessite un remodelage constant afin de maintenir la forme cellulaire et permettre la division. Ce remodelage fait intervenir différentes synthèses et hydrolases dont l'activité et la coordination spatio-temporelle doivent être finement



régulées et coordonnées au cours de la croissance bactérienne.

#### 2.2.4.1 Hydrolases

Il existe un grand nombre d'hydrolases ciblant la très grande majorité des liaisons du PG. Leurs rôles sont très variés : ces enzymes interviennent dans la régulation de la croissance cellulaire et de la morphologie (FRIRDICH et GAYNOR, 2013), le recyclage du PG, la séparation des cellules filles, l'autolyse, l'ancrage de complexes de surface, la sporulation, la germination ou encore la modulation de la réponse inflammatoire de l'hôte (pour revue sur les hydrolases : VOLLMER et al., 2008).

Les hydrolases qui clivent les chaînes glycanes se nomment glycosidases et peuvent être classées en trois catégories : les glucosaminidases hydrolysent la liaison  $\beta(1-4)$  entre les GlcNAc et acides MurNAc, les lysozymes hydrolysent la liaison  $\beta(1-4)$  entre les acides MurNAc et GlcNAc et les transglycosylases lytiques (LTs) clivent la même liaison mais en produisant un cycle anhydre. Les LTs sont dites exolytiques lorsqu'elles clivent à la fin d'une chaîne glycane, ou endolytiques si le clivage a lieu au milieu d'une chaîne.

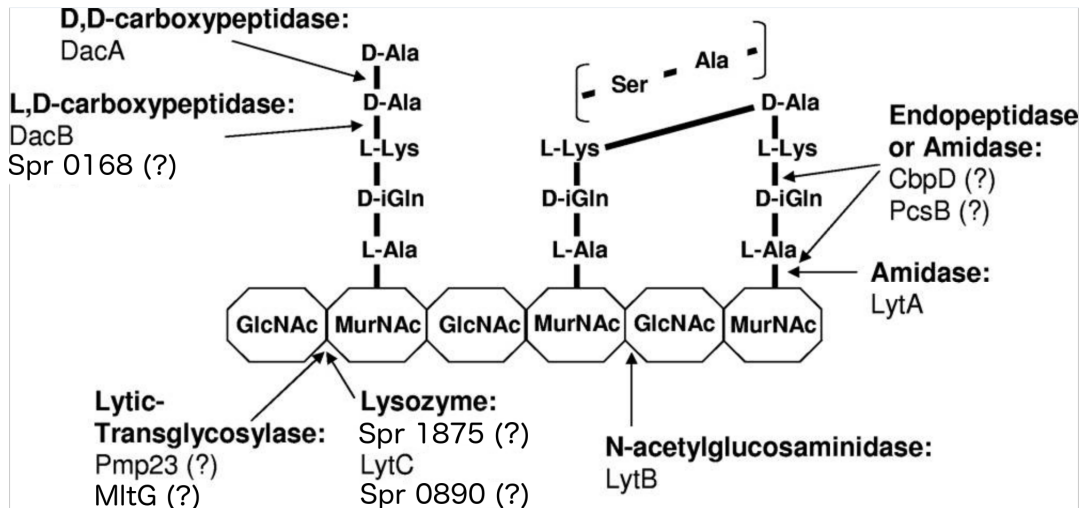
Les hydrolases ciblant les brins peptidiques comprennent les amidases qui clivent les liaisons MurNAc-L-Ala entre la chaîne glycane et le peptide et les peptidases qui hydrolysent les liaisons amides au sein des peptides. Les carboxypeptidases enlèvent les résidus C-terminaux et les endopeptidases clivent les liaisons internes. Si le clivage par les endopeptidases ou les carboxypeptidases a lieu entre deux D-acides aminés ou un D-acide aminé et un L-acide aminé, elles sont respectivement nommées DD-peptidases et LD ou DL-peptidases.

Le génome de *S. pneumoniae* code pour douze hydrolases du PG prédites (BARENDT, SHAM et WINKLER, 2011), présentées ci-après, qui interviennent dans la maturation du PG, le maintien de la morphologie, la lyse, le clivage du septum lors de la division et la résistance aux antibiotiques (Figure 2.12 page 57).

- L'amidase LytA est responsable de l'autolyse en phase stationnaire et de la lyse induite par les antibiotiques (cf page 36). Elle participe aussi avec la muramidase LytC et CbpD à la lyse fratricide (cf page 43).

- LytB est une CBP endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase qui se localise aux pôles des cellules (DE LAS RIVAS et al., 2002) et sépare les cellules filles à la fin de la division cellulaire (cf page 46).

- DacA (PBP3) est une PBP de classe C qui possède une activité D,D-carboxypeptidase qui libère les D-Ala-D-Ala terminaux des pentapeptides pour former des tripeptides (SEVERIN et al., 1992) et DacB (LdcB) est une LD-carboxypeptidase qui transforme les tetrapeptides en tripeptides (HOYLAND et



**FIGURE 2.12** – Schéma des sites d'action des hydrolases du PG de *S. pneumoniae*. Les points d'interrogations indiquent les hydrolases pour lesquelles l'activité n'a pas été confirmée par des analyses biochimiques. MurNAc : acide *N*-acetyl muramique, GlcNAc : *N*-acetylglucosamine. Illustration adaptée de BARENDT, SHAM et WINKLER, 2011.

al., 2014). Les souches exprimant des formes mutées de DacA et DacB présentent des problèmes de morphologie dont des défauts de positionnement du septum. Ce phénotype démontre l'importance de la régulation de la structure des brins peptidiques dans la régulation de la synthèse du PG (ABDULLAH et al., 2014 ; BARENDT, SHAM et WINKLER, 2011).

- PcsB est une protéine essentielle du pneumocoque qui se localise au site de division et permet une synthèse correcte du septum et la séparation des cellules filles (SHAM et al., 2011 ; BARTUAL et al., 2014).

- Pmp23 est une hydrolase membranaire prédite comme étant une transglycosylase lytique. Sa délétion induit d'important défauts morphologiques affectant la formation et la localisation du septum et une augmentation de la sensibilité aux  $\beta$ -lactamines mais son rôle précis dans le métabolisme du PG n'a pas encore été déterminé (PAGLIERO et al., 2008).

- MltG est une transglycosylase endolytique identifiée chez *E. coli*, très conservée chez les bactéries dont *S. pneumoniae*. Son rôle serait de couper les chaînes de glycanes néosynthétisées par PBP1a et ensuite réticulées par le complexe PBP2b/RodA au cours de la synthèse périphérique du PG (YUNCK, CHO et BERNHARDT, 2016 ; TSUI et al., 2016).

- Enfin, il existe des hydrolases dont la fonction reste inconnue. *Spr0890* et *Spr0168* n'affecteraient pas la division ; *Spr0096* ; *Spr0709* pourraient appartenir à la famille des SEDS dont la délétion induit une incorporation aberrante de peptides

dans le PG (BARENDT, SHAM et WINKLER, 2011). *Spr1875* est prédite comme une N-acetylmuramidase, impliquée dans la virulence (PEPPOLONI et al., 2013; CARDACI et al., 2012).

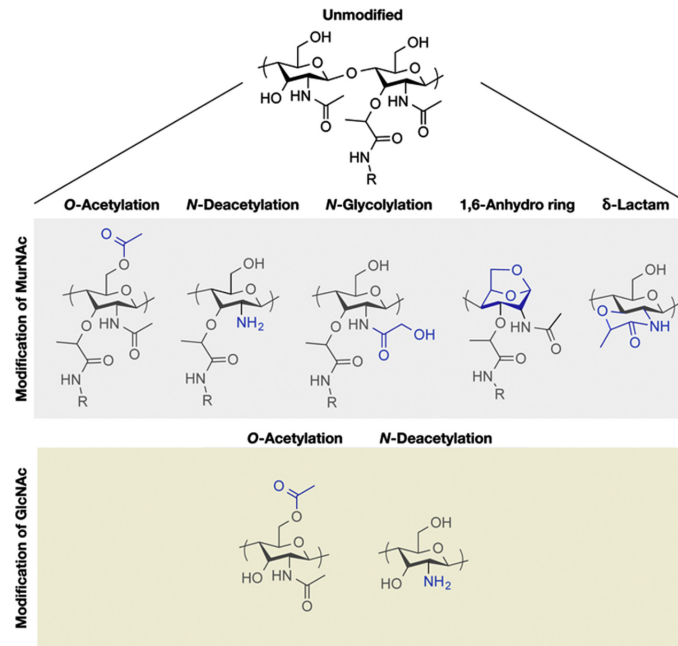
Enfin, contrairement à d'autres bactéries comme *B. subtilis* et *E. coli*, le renouvellement du PG est mineur chez *S. pneumoniae*, le "vieux" PG restant stable au niveau des hémisphères des cellules. Lorsque le renouvellement du PG est actif, les fragments de PG libérés par ce mécanisme sont utilisés par de nombreuses bactéries comme intermédiaires métaboliques dans la régulation de la résistance aux antibiotiques et de la réponse au système immunitaire. Chez *S. pneumoniae*, l'absence de renouvellement pourrait contribuer à l'évasion du système immunitaire (BOERSMA et al., 2015).

#### 2.2.4.2 Modifications chimiques post-synthétiques

Les chaînes glycanes subissent aussi différentes modifications post-synthétiques qui représentent une stratégie importante pour contrôler le métabolisme cellulaire, l'activité des hydrolases du PG endogènes ou exogènes et échapper au système immunitaire. Ces modifications, représentées figure 2.13 page 59 sont communément la N-deacétylation et la O-acétylation (VOLLMER, 2008). La N-glycolylation des chaînes glycanes est spécifique de *Mycobacterium tuberculosis* et d'espèces proches (AZUMA et al., 1970). La formation du MurNAc 1,6 anhydro- résulte du clivage par une transglycosylase lytique lors du renouvellement du PG de certaines bactéries, et le  $\delta$ -lactame est une modification spécifique du peptidoglycane des spores des espèces *Bacillus* et *Clostridium*.

##### - N-déacétylation.

La N-déacétylation des résidus GlcNAc est catalysée par la N-acetyl-D-glucosamine amidohyrolase PgdA qui a été identifiée pour la première fois chez *S. pneumoniae* (VOLLMER et TOMASZ, 2000; BLAIR et al., 2005). Cette modification est impliquée dans la résistance au lysozyme, une muramidase de l'hôte qui clive les liaisons glycosidiques entre les résidus GlcNAc et les MurNAc. Comme d'autres bactéries à Gram positif, *S. pneumoniae* est naturellement résistant au lysozyme du fait d'une grande proportion de N-deacétylation du PG, environ 80 % des résidus GlcNAc et 10 % des résidus MurNAc (VOLLMER et TOMASZ, 2000). Cependant, cette protection n'est plus présente lorsque les cellules atteignent la phase stationnaire de croissance, durant laquelle le lysozyme augmente la rapidité de l'autolyse du pneumocoque (OHNO, YADOMAE et MIYAZAKI, 1982).



**FIGURE 2.13** – Modifications recensées des chaînes glycanes du PG. Ces modifications sont présentes chez les bactéries à Gram positif et négatif. Schéma de MOYNIHAN, SYCHANTHA et CLARKE, 2014.

Le mutant *pgdA* possède une virulence atténuée et des effets indépendants du lysozyme sur le fitness bactérien durant la colonisation et la résistance aux neutrophiles, ce qui montre que la N-déacétylation jouerait aussi un rôle dans la virulence bactérienne (VOLLMER et TOMASZ, 2002 ; DAVIS et al., 2008). La délétion de *pgdA* induit aussi une augmentation de huit fois l'expression de la capsule polysaccharidique de type 4 à la surface bactérienne. L'absence de N-déacétylation des résidus GlcNAc conduirait à la formation d'une paroi dont la charge positive serait réduite, ce qui affecterait l'attachement de molécules anioniques telle que la capsule (DAVIS et al., 2008). Il a récemment été démontré que la capsule polysaccharidique du pneumocoque est ancrée sur le peptidoglycane via les résidus GlcNAc et non les résidus MurNAc comme cela a longtemps été proposé (LARSON et YOTHER, 2017). Ce résultat renforce l'hypothèse que PgdA jouerait un rôle dans la régulation de l'attachement de la capsule polysaccharidique au PG.

La N-déacétylation des résidus glycanes a aussi été mise en évidence dans la régulation des hydrolases du PG. Chez *Lactococcus lactis*, outre l'augmentation de la résistance au lysozyme, la N-déacétylation des résidus GlcNAc protège le PG de l'hydrolyse par l'autolysine AcmA (VEIGA et al., 2007a ; MEYRAND et al., 2007). Chez *S. pneumoniae*, cette modification serait impliquée dans la régulation de l'hydrolase LytB responsable de la séparation des cellules filles à la fin de la division (cf page 46). En effet, alors que la majorité des GlcNAc sont N-déacétylés par PgdA, LytB clive,

au niveau des pôles, uniquement les liaisons glucosidiques GlcNAc- $\beta$ -(1,4)-MurNAc, dont le GlcNAc n'a pas été N-déacétylé (RICO-LASTRES et al., 2015; BAI et al., 2014).

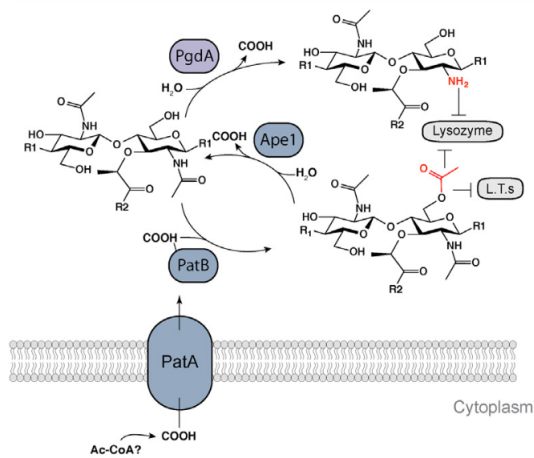
#### - O-acétylation.

La O-acétylation du MurNAc du peptidoglycane est présente chez de nombreuses bactéries à Gram positif et négatif à l'exception des entérobactéries (Figure 2.14 page 61). Cette modification a majoritairement lieu sur le groupement hydroxyl du carbone 6 du résidu muramoyl, formant ainsi un dérivé 2,6-N,O-diacetyl. La O-acétylation du résidu GlcNAc a été détectée chez *B. anthracis* et d'autres bactéries à Gram positif comme *Lactobacillus plantarum* (BERNARD et al., 2011). Le pourcentage de O-acétylation du peptidoglycane varie de façon importante (de 20 à 70%) selon l'espèce bactérienne étudiée, la souche et les conditions de croissance (pour revues : CLARKE et DUPONT, 1992; CLARKE, STRATING et BLACKBURN, 2002; VOLLMER, 2008; MOYNIHAN et CLARKE, 2011; MOYNIHAN, SYCHANATHA et CLARKE, 2014).

Chez *S. pneumoniae*, elle concerne uniquement les résidus MurNAc. La O-acétylation est une modification très labile et de ce fait rapidement perdue au cours de la préparation de PG nécessitant un pH acide et des températures élevées. Malgré une analyse mise au point pour préserver les groupements O-acetyl labiles, la détection et la quantification des fragments de PG O-acétylés chez *S. pneumoniae* s'avère difficile (BERA et al., 2005; CRISOSTOMO et al., 2006; VOLLMER, 2008). Une autre difficulté avancée par notre collaborateur Nicolas Gisch de l'Université de Borstel (Allemagne) est qu'il est difficile d'obtenir une quantité suffisante de fragments de PG de petite taille afin de réaliser la quantification de la O-acétylation. L'analyse de la composition du PG par BUI et al., 2012 a détecté 8% de O-acétylation des trimères après digestion du PG par LytA et malgré un traitement à l'acide hydrofluorique. Cela correspond à moins de 1% du peptidoglycane totale.

**Protéines responsables de la O-acétylation.** Chez les bactéries à Gram positif, la protéine responsable de la O-acétylation OatA a été identifiée pour la première fois chez *S. aureus* (BERA et al., 2005) (Figure 2.14 page 61). Le gène *oatA* code pour une protéine prédite membranaire intégrale composée de deux domaines. Le domaine N-terminal contenant onze hélices transmembranaires serait responsable du transfert du groupement acétyl (BERA et al., 2005) et le domaine C-terminal globulaire, prédit comme étant exposé à la surface bactérienne, serait le site catalytique responsable de la O-acétylation du PG (BERA et al., 2006). Des homologues ont été identifiés chez *S. pneumoniae* chez qui elle se nomme Adr (CRISOSTOMO et al.,

## Gram-Negative Bacteria



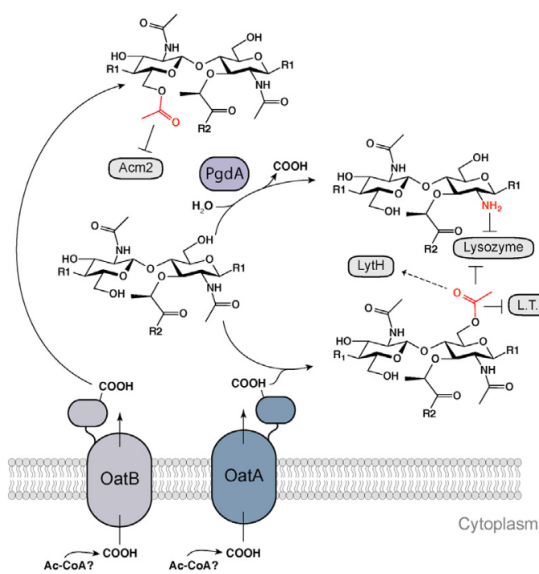
### O-Acetylating Bacteria

<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Proteus myxofaciens</i>
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Proteus penneri</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Providencia heimbachae</i>
<i>Morganella morganii</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Neisseria lactamica</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Synchocystis sp.</i>
<i>Neisseria perflava</i>	

### N-Deacetylating Bacteria

<i>Escherichia coli</i> / <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> (Bdelloplast)
<i>Helicobacter pylori</i>

## Gram-Positive Bacteria



### MurNAc O-Acetylating Bacteria

<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	

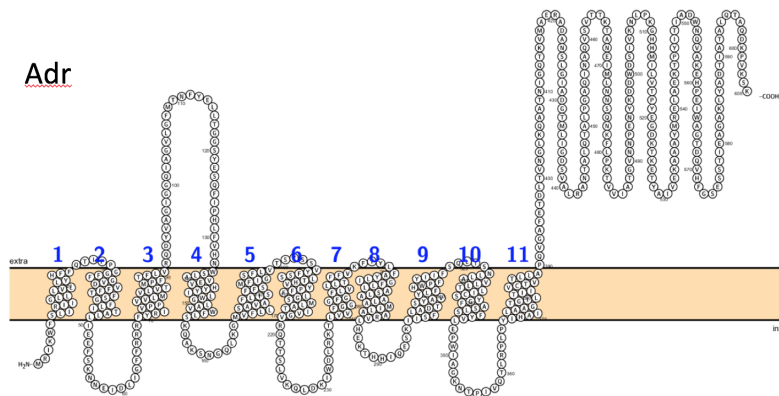
### GlcNAc O-Acetylating Bacteria

<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>
<i>Lactobacillus sakei</i>	

### N-Deacetylating Bacteria

<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Rhodopseudomonas sp.</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Streptococcus suis</i>

**FIGURE 2.14 – Modifications chimiques des chaînes glycanes du PG** Les mécanismes de O-acétylation ont été démontrés expérimentalement pour les bactéries citées ci-dessus. Chez les bactéries à Gram négatif, la O-acétylation du résidu MurNAc du PG est réalisée par deux protéines. PatA transfère le groupement acétate du cytoplasme vers le périplasma et PatB catalyse la réaction de O-acétylation. Ces protéines fonctionnent de concert avec Ape1 qui ôte le groupement acétate afin de permettre le clivage par les transglycosylases lytiques de la bactérie. Chez les bactéries à Gram positif, la O-acétylation du résidu MurNAc est catalysée par OatA dont le domaine N-terminale est supposé transporter le groupement acétate et le domaine C-terminal catalyse le transfert du groupement acétyle. La O-acétylation du GlcNAc est réalisée par OatB, un homologue de OatA dont l'activité a été mise en évidence chez *Lactococcus plantarum*, puis identifiée chez *L. sakei* et *Weissella*. Les enzymes inhibées ou activées par ces modifications sont indiquées par les bulles grises, LTs : transglycosylases lytiques, R1 : suite de la chaîne glycanes, R2 : chaîne peptidique. Schéma de MOYNIHAN, SYCHANTHA et CLARKE, 2014.



**FIGURE 2.15 – Topologie de ADR, O-acétylase du PG chez *S. pneumoniae*.** ADR possède un domaine N-terminal contenant onze hélices transmembranaires responsables de la translocation du groupement acétate du cytoplasme vers la surface bactérienne et un domaine extracellulaire catalysant la réaction de O-acétylation du PG. Topologie générée par le logiciel Protter à partir de la séquence protéique de ADR (OMASITS et al., 2014).

2006) (Figure 2.15 page 62) et *E. faecalis* (HÉBERT et al., 2007).

La plupart des bactéries à Gram positif possèdent des homologues de OatA alors que chez les bactéries à Gram négatif, deux protéines interviennent pour la fonction de O-acétylation. La protéine membranaire intégrale PatA transloque le groupement acétate du cytoplasme vers le périplasma et la protéine PatB catalyse le transfert du groupement acétate sur le PG. Le cluster de gènes nommé OAP (**O**-**A**cétylation du **P**eptidoglycane) qui code pour ces deux protéines contient également la O-acétylpeptidoglycane estérase Ape responsable de l'hydrolyse du groupement O-acétyl. Chez *Neisseria meningitidis*, la dé-O-acétylation par ApeI régule l'élongation des chaînes glycanes et la taille des cellules, ce qui contribue au fitness bactérien chez l'hôte (VEYRIER et al., 2013). Chez *Campylobacter jejuni*, la délétion *apeI* induit une augmentation de la O-acétylation du PG, modifiant ainsi la composition du PG, ce qui affecte les processus de la pathogénèse (HA et al., 2016 ; IWATA et al., 2016).

Le cluster OAP est aussi présent chez quelques bactéries à Gram positif du genre *Bacillus* (WEADGE, PFEFFER et CLARKE, 2005). Chez *Bacillus anthracis*, il joue un rôle dans la division cellulaire, l'ancrage de structures de surface (LAABERKI et al., 2011) et l'acétylation de polysaccharide secondaire de la paroi (LUNDERBERG et al., 2013).

**Rôle dans la régulation d'enzymes de clivage du PG.** Les transglycosylases lytiques, qui sont particulièrement abondantes chez les bactéries à Gram négatif, ne peuvent pas cliver les liaisons impliquant un résidu MurNAc O-acétylé des chaînes glycanes car cela nécessite un groupement C6-OH libre afin de former un cycle 1,6-anhydro (Figure 2.13 page 59). Par conséquent, PatA/PatB et Ape

fonctionnent ensemble afin de réguler l'activité transglycosylase d'autolysines impliquées dans le métabolisme du PG chez les bactéries à Gram négatif. Leur action coordonnée serait un moyen de localiser spécifiquement l'activité de ces enzymes afin de participer au bon déroulement de la division (WEADGE, PFEFFER et CLARKE, 2005 ; WEADGE et CLARKE, 2005), bien qu'il ne soit pas encore reconnu si la O-acétylation du PG a lieu sur toute la surface cellulaire ou si elle est localisée dans les zones actives de division (MOYNIHAN, SYCHANTHA et CLARKE, 2014).

Différentes études ont montré que le lipide II (précurseur du PG) n'était pas O-acétylé et que seules les sous-unités non O-acétylés sont intégrées dans le PG, comme cela a été observé chez *Proteus mirabilis* et *Neisseria gonorrhoeae* (revue : CLARKE et DUPONT, 1992 ; VOLLMER, 2008). Ces résultats suggèrent que la O-acétylation du PG serait un évènement post-synthétique de maturation. Le donneur d'acétate n'a pas été identifié mais serait probablement l'acetyl-coenzyme A (CoA) ou l'acétyl phosphate présents dans le cytoplasme.

Les bactéries à Gram positif dont le PG est O-acétylé grâce à des homologues de OatA, comme dans le cas de *S. pneumoniae*, ne possèdent pas de O-acétylpeptidoglycane esterase pour réguler l'activité des transglycosylases lytiques (LTs).

Ces enzymes ne pourraient donc couper le PG que dans les régions non-O-acétylées (MOYNIHAN et CLARKE, 2011).

En ce qui concerne les autres types d'enzymes clivant le PG, des études chez *Proteus mirabilis* (STRATING et CLARKE, 2001) et *E. faecalis* (PFEFFER et al., 2006) ont montré que les autolysines de ces bactéries possèdent des spécificités différentes en fonction de l'état de O-acétylation du PG. Le degré de O-acétylation du PG de *E. faecalis* augmente avec l'âge de la culture ce qui préviendrait l'autolyse des cellules en phase stationnaire par certaines autolysines (PFEFFER et al., 2006). Chez *L. plantarum*, l'autolysine LytH prédite comme étant une N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (BERNARD et al., 2011) serait à l'inverse plus active sur le PG O-acétylé.

La O-acétylation du GlcNAc, qui est plus rare, est réalisée par OatB. Chez *Lactobacillus plantarum*, elle joue un rôle dans la régulation de l'autolysine majeure Acm2 (BERNARD et al., 2011) (Figure 2.14 page 61).

**Rôle dans la virulence et la réponse immunitaire.** Chez *S. pneumoniae*, la N-déacétylation par PgdA (VOLLMER et TOMASZ, 2000) et la O-acétylation catalysée par Adr (CRISOSTOMO et al., 2006) agissent en synergie dans la résistance



au lysozyme mais possèdent aussi un effet indépendant de la résistance au lysozyme sur le fitness bactérien et la résistance aux neutrophiles. La délétion du gène *adr* induit notamment une autolyse induite par LytA en phase stationnaire plus rapide que dans la souche sauvage (CRISOSTOMO et al., 2006). Cette observation est le point de départ de la première publication présentée dans ce manuscrit.

Comme mentionné précédemment, la O-acétylation du MurNAc est impliquée dans la résistance au lysozyme chez de nombreuses bactéries dont plusieurs pathogènes importants tels que *S. pneumoniae*, *E. faecalis* ou *S. aureus*, dans la pathogénèse et l'évasion du système immunitaire chez *S. pneumoniae*, *S. aureus* ou encore *C. jejuni* chez qui elle intervient en plus dans la motilité et la formation de biofilms (BERA et al., 2004; BERA et al., 2006; CRISOSTOMO et al., 2006; HÉBERT et al., 2007; SHIMADA et al., 2010; AUBRY et al., 2011; HA et al., 2016). Mais ce rôle dans la résistance au lysozyme a aussi un impact sur l'hôte. Les fragments de haut poids moléculaires de PG O-acétylés, non dégradés par le lysozyme, persistent dans l'organisme (BLUNDELL et al., 1980; ROSENTHAL, BLUNDELL et PERKINS, 1982; SWIM et al., 1983; FLEMING, WALLSMITH et ROSENTHAL, 1986; VOLLMER et al., 2008) et seraient responsables d'autres maladies comme l'arthrite rhumatoïde, une maladie auto-immune qui peut être déclenchée chez le modèle animal par l'administration de fragments de PG de haut poids moléculaires (HAMERMAN, 1966; FOX et al., 1982; ESSER et al., 1985; KOGA et al., 1985; STIMPSON et al., 1986; FLEMING, WALLSMITH et ROSENTHAL, 1986; VOLLMER et al., 2008).

**Rôle de la O-acétylation dans la résistance aux antibiotiques.** Cette modification chimique du PG est aussi impliquée dans la résistance aux antibiotiques. Chez *E. faecalis*, il a été montré que les souches résistantes à la vancomycine contiennent un taux plus important de O-acétylation et de N-déacétylation du PG en présence de vancomycine (CHANG et al., 2017b). Chez *S. aureus*, en présence de delecyl-oritavancine, un dérivé de la vancomycine, le taux de O-acétylation du PG diminue alors que celui de N-déacétylation augmente (CHANG et al., 2017a).

Chez de nombreuses bactéries dont *S. pneumoniae* (CRISOSTOMO et al., 2006), ou plus récemment *Listeria monocytogenes* (AUBRY et al., 2011), il a été montré que la O-acétylation est impliquée dans la résistance aux  $\beta$ -lactamines et donc jouerait un rôle dans la transpeptidation du PG par un mécanisme encore inconnu (pour revue complète : VOLLMER et al., 2008). Le degré de O-acétylation du PG est significativement réduit lors d'un traitement à la pénicilline chez plusieurs bactéries dont

*N. gonorrhoeae* (BLUNDELL et PERKINS, 1981 ; DOUGHERTY, 1985 ; DOUGHERTY, 1983), *S. aureus* (BURGHAUS et al., 1983 ; SIDOW, JOHANNSEN et LABISCHINSKI, 1990) et *P. mirabilis* (MARTIN et GMEINER, 1979).

Chez *N. gonorrhoeae*, la diminution de la O-acétylation est indirectement liée à l'inactivation de la carboxypeptidase PBP2 par la pénicilline (DOUGHERTY, 1985 ; DOUGHERTY, 1983). Chez *S. pneumoniae*, l'inactivation du gène *adr* et donc l'absence de O-acétylation du PG dans la souche Pen6 résistante à la pénicilline, induit une augmentation importante de sa sensibilité à la pénicilline (CRISOSTOMO et al., 2006). De ce fait il a été proposé que la O-acétylation du PG serait nécessaire au fonctionnement des PBPs en présence d'antibiotique.

Chez *S. aureus*, des cellules traitées à la pénicilline présentent une diminution de la O-acétylation avant le début de la lyse, ce qui suggère que la diminution de la O-acétylation serait un pré-requis à l'autolyse (SIDOW, JOHANNSEN et LABISCHINSKI, 1990). A l'inverse, le traitement de cette bactérie avec des antibiotiques bactériostatiques augmente le niveau de O-acétylation du PG, ce qui mimerait la phase stationnaire durant laquelle le niveau de O-acétylation est augmenté (BURGHAUS et al., 1983). Cette augmentation de la O-acétylation en phase stationnaire a aussi été observée chez différentes espèces appartenant au genre *Enterococcus* et particulièrement *E. faecalis* dans son état viable mais non cultivable (PFEFFER et al., 2006).

Enfin, en ce qui concerne les mécanismes de régulation du niveau de O-acétylation du PG, ils restent encore très peu connus. Chez *L. lactis*, il a été montré que le gène codant OatA est activé au niveau transcriptionnel en réponse à des stress de la paroi bactérienne provoqués par le lysozyme, la vancomycine et d'autres molécules antimicrobiennes (VEIGA et al., 2007b ; MARTÍNEZ et al., 2007).

Pour conclure, le PG est donc une structure très dynamique. L'étude de la composition précise du PG de *S. pneumoniae* réalisée par BUI et al., 2012 reflète la diversité induite par l'ensemble de ces modifications. Les étapes de biosynthèse et modifications post-synthétiques constantes confère une plasticité importante au PG (revue : CAVA et PEDRO, 2014) en fonction des conditions environnementales dont la pression de sélection a aussi influencé l'évolution des mécanismes de biosynthèse du PG (MAINARDI et al., 2008).

Les mécanismes permettant le grossissement et la division du sacculus de PG lors de la croissance sont peu compris mais les études montrent que cette macromolécule subit un remodelage constant par des complexes de protéines impliquant des synthases, des hydrolases et des protéines impliquées dans la morphogénèse.



# 3

## Division

### Sommaire

---

<b>3.1</b>	<b>Modèle de division du pneumocoque . . . . .</b>	<b>68</b>
3.1.1	Sélection du site de division . . . . .	68
3.1.2	L'élongasome . . . . .	70
3.1.3	Le divisome . . . . .	72
3.1.4	Coordination des machineries de synthèse périphérique et septale . . . . .	73
<b>3.2</b>	<b>Régulation de la division . . . . .</b>	<b>75</b>
3.2.1	Les régulateurs globaux StkP et PhpP . . . . .	75
3.2.2	DivIVA et GpsB . . . . .	76
<b>3.3</b>	<b>Rôle des TA dans la division et la morphogenèse . . . . .</b>	<b>77</b>

---

## 3.1 Modèle de division du pneumocoque

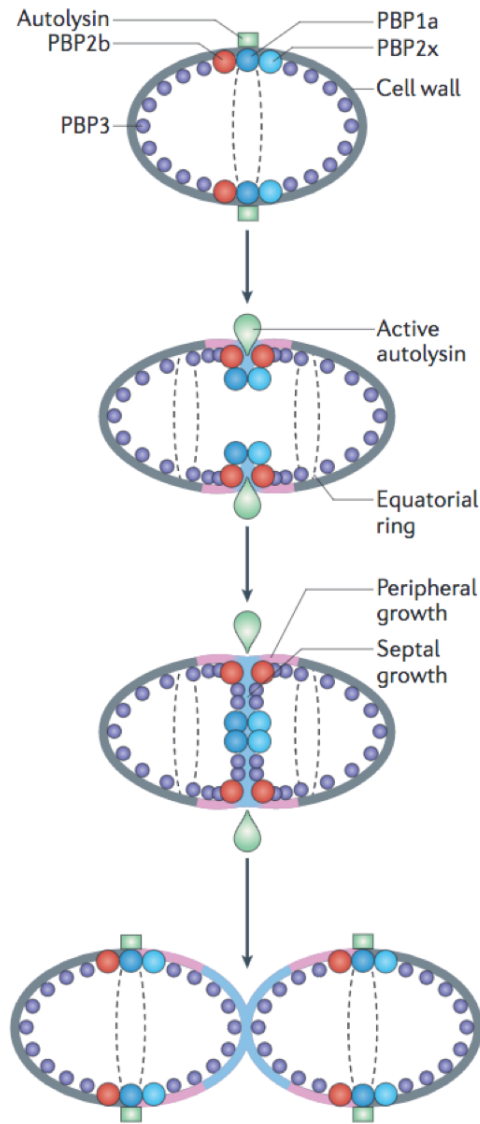
*S. pneumoniae* est un coque de forme ovoïde, un groupe morphologique qui inclut plusieurs pathogènes humains tels que les entérocoques et les streptocoques. Le mécanisme de morphogénèse des bactéries ovocoques est distinct de celui des coques comme *Staphylococcus aureus* ou des bâtonnets comme *Bacillus subtilis* du fait qu'il résulte de deux mécanismes d'insertion du PG, se situant sur le plan médian de la cellule où se localisent toutes les synthétases PBP1a, PBP1b, PBP2a, PBP2x et PBP2b. La synthèse périphérique de PG induit l'élongation de la cellule mère et la synthèse septale de PG à la formation du septum à partir duquel deux cellules filles s'individualisent (ZAPUN, VERNET et PINHO, 2008). Les complexes protéiques impliqués dans ces mécanismes se nomment respectivement divisome et élongasome et sont positionnés et contrôlés par des éléments du cytosquelette (revue : TYPAS et al., 2011).

Le modèle actuel de croissance et division des ovocoques se base sur les études de l'ultrastructure morphologique de *E. faecalis* réalisées dans les années 70 (HIGGINS et SHOCKMAN, 1976) qui ont par ailleurs été confirmées par des techniques de microscopie super-résolue (WHEELER et al., 2011). Un anneau équatorial définit le site de synthèse de la paroi. Les nouveaux hémisphères sont synthétisés par la croissance périphérique, caractérisée par une élongation et une constriction simultanées, jusqu'à ce que le nouvel hémisphère atteigne la même taille que l'ancien et que la synthèse septale ferme le septum (Figure 3.1 page 69).

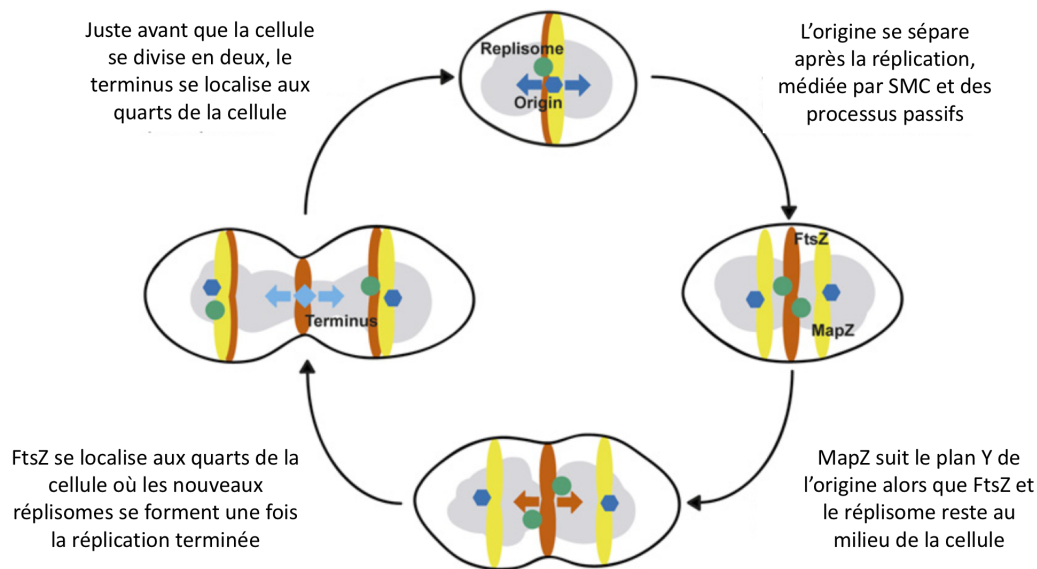
L'hypothèse actuelle est qu'une machinerie unique serait responsable des croissances périphérique et septale combinant les protéines du divisome et de l'élongasome (MASSIDDA, NOVÁKOVÁ et VOLLMER, 2013).

### 3.1.1 Sélection du site de division

Le positionnement correct des protéines de la division est un élément clé pour le bon déroulement de la division. Des données récentes montrent que chez le pneumocoque la sélection précise du site de division est guidée par l'organisation et la ségrégation correcte du chromosome (RAAPHORST, KJOS et VEENING, 2017). Contrairement à d'autres bactérie comme *B. subtilis* (WANG, MONTERO LLOPIS et RUDNER, 2014; WANG et RUDNER, 2014), les origines de répllication de l'ADN chez *S. pneumoniae* ne se localisent jamais vers les pôles et les nouvelles origines dupliquées marquent immédiatement les futurs sites de division et coïncident avec la formation de l'anneau Z, alors que le terminus reste au milieu de la cellule (Figure 3.2 page 70). Il a de plus été montré que la condensine SMC (Structural Maintenance



**FIGURE 3.1 – Synthèse du PG et division chez les ovococques tel que *S. pneumoniae*.** La synthèse septale et périphérique du PG ont toutes deux lieu durant la division. La synthèse septale, catalysée par PBP1a et PBP2x, a lieu au site de division et la synthèse périphérique catalysée par PBP2b proche du site de division permet l'insertion de PG entre les sites de division actuel et futur ce qui résulte en l'élongation de la cellule. Les autres PBPs (PBP1b, PBP2a et PBP3) sont aussi impliquées dans ce mécanisme mais leur rôle exact est encore inconnu (PINHO, KJOS et VEENING, 2013).



**FIGURE 3.2 – Modèle de la sélection du site de division chez *S. pneumoniae*.** Le chromosome est représenté en gris, l'origine de réplication de ses bras gauche et droite et le terminus sont respectivement en bleu foncé, vert et bleu clair. MapZ est représenté en jaune et FtsZ en orange. Adapté de RAAPHORST, KJOS et VEENING, 2017.

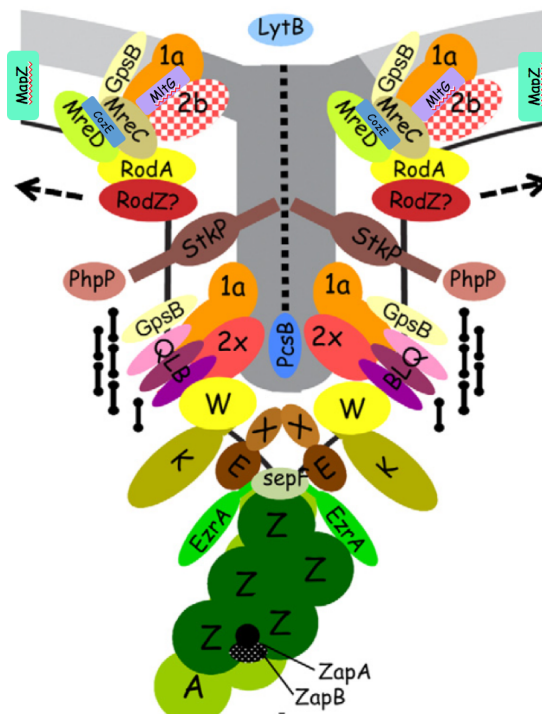
of Chromosomes) (MINNEN et al., 2011) participe à la ségrégation et la localisation correcte de l'origine de réplication de l'ADN (RAAPHORST, KJOS et VEENING, 2017).

MapZ ou LocZ est une protéine membranaire interagissant avec le PG (MANUSE et al., 2016), elle forme un anneau au site de division. Poussé par la synthèse périphérique du PG générant la nouvelle moitié des cellules filles, cet anneau se sépare en deux anneaux qui migrent jusqu'aux futurs sites de division avant FtsZ et FtsA et positionne ainsi l'anneau Z correctement par interaction protéique avec ce dernier (FLEURIE et al., 2014b; HOLEČKOVÁ et al., 2014) (Figure 3.2 page 70). MapZ s'avère cruciale pour le placement correct de l'anneau Z, perpendiculairement à l'axe longitudinal du pneumocoque (RAAPHORST, KJOS et VEENING, 2017) et contrôlerait indirectement sa constriction (FLEURIE et al., 2014b). Les autres protéines de la division sont recrutées uniquement après que l'anneau-Z soit positionné.

La figure 3.3 page 71 schématise tous les acteurs de la division du pneumocoque mentionnés ci-après.

### 3.1.2 L'élongasome

L'élongasome qui synthétise le PG périphérique contient les synthases PBP1a, PBP2b et les protéines MreC, MreD, GpsB, RodA, RodZ (revues : MASSIDDA,



**FIGURE 3.3** – Schéma de la machinerie de synthèse du PG contenant les complexes impliqués dans l'élongation et la division chez *S. pneumoniae*. Le PG périphérique est en gris clair et le PG septal en trait pointillé gris foncé. Z, A, E, X, K, Q, B, L, W, 1a, 2x et 2b représentent respectivement FtsZ, FtsA, FtsE, FtsX, FtsQ (DivIVB), FtsB (DivIC), FtsL, FtsW, PBP1a, PBP2x et PBP2b. Les barres noires représentent DivIVA. Les localisations de ZapA, ZapB, EzrA, SepF et RodA sont extrapolées des résultats obtenus chez les bactéries en forme de bâtonnet. Adapté de MASSIDDA, NOVÁKOVÁ et VOLLMER, 2013.



NOVÁKOVÁ et VOLLMER, 2013 ; PHILIPPE, 2014) ainsi que les protéines récemment découvertes CozE (FENTON et al., 2016) et MltG (TSUI et al., 2016).

RodA est une protéine SEDS qui transfère le lipide II à la surface cellulaire et qui présenterait aussi une activité glycosyltransférase (MEESKE et al., 2016 ; EMAMI et al., 2017). D'après son homologue chez les bactéries en forme de bâtonnet comme *E. Coli*, RodZ serait impliquée dans la régulation de l'élongasome, mais son rôle précis chez *S. pneumoniae* est encore inconnu (SHIOMI et al., 2013 ; MASSIDDA, NOVÁKOVÁ et VOLLMER, 2013 ; PHILIPPE, 2014).

Chez les bactéries en forme de bâtonnet, MreC et MreD font partie du système Rod responsable de l'élongation cylindrique de la cellule (KRUSE, BORK-JENSEN et GERDES, 2004). Le système est organisé par les filaments dynamiques de la protéine actin-like MreB qui facilite l'incorporation de PG à différents endroits du cylindre (JONES, CARBALLIDO-LÓPEZ et ERRINGTON, 2001). A l'inverse, les ovoques comme le pneumocoque ne possède pas MreB et l'élongation est restreinte à la zone périphérique de l'anneau équatorial (TSUI et al., 2014).

Une nouvelle protéine de l'élongasome, CozE (Coordinateur de l'élongation zonale) a récemment été identifiée. Cette protéine s'avère être un membre du complexe MreCD qui dirige l'activité de PBP1a au milieu de la cellule où elle promeut l'élongation cellulaire et participe ainsi à la morphogenèse correcte du pneumocoque (FENTON et al., 2016).

Enfin, MltG se localise avec les protéines de la machinerie de synthèse périphérique du PG. Elle libérerait les chaînes de PG synthétisées par PBP1a pour la réticulation par le complexe PBP2b/RodA dans la synthèse du PG septal (TSUI et al., 2016).

### 3.1.3 Le divisome

L'anneau Z est formé par la protéine clé qui orchestre la division FtsZ, une GTPase "tubuline-like". Cet anneau Z situé au milieu de la cellule recrute l'ensemble des protéines de synthèse du PG nécessaire à l'élongation et à la division (FLEURIE et al., 2014a, revue : EGAN et VOLLMER, 2013) et se contracte lors de la septation. L'étude de l'ultrastructure de l'anneau Z par microscopie super-résolue suggère que l'anneau observée en microscopie conventionnelle est en fait composé de clusters de proto-filaments de FtsZ (JACQ et al., 2015).

La protéine FtsA qui colocalise avec FtsZ est un homologue de l'actine, essentielle chez le pneumocoque. Elle est nécessaire à la formation et la stabilisation de l'anneau Z en se fixant sur FtsZ à la membrane via une hélice amphipatique C-terminale interagissant avec la membrane (KRUPKA et al., 2014). Ces deux pro-

téines coordonneraient les synthèses périphérique et septale du PG (MURA et al., 2016).

Plusieurs protéines dont ZapA, EzrA (FLEURIE et al., 2014a) et SepF (FADDA et al., 2003; GÜNDOĞDU et al., 2011; DUMAN et al., 2013) réguleraient aussi la dynamique de l'anneau Z ou son ancrage à la membrane.

Les autres protéines du divisome : le complexe FtsQ (DivIB)/FtsB (DivIC)/FtsL dont la fonction est inconnue, DivIVA, la flippase du lipide II FtsW et les synthases PBP2x et PBP1a se localisent au site de division après l'assemblage de l'anneau Z pour former le divisome mature (MORLOT et al., 2003; MORLOT et al., 2004; NOIRCLERC-SAVOYE et al., 2005; FADDA et al., 2007; BEILHARZ et al., 2012).

### 3.1.4 Coordination des machineries de synthèse périphérique et septale

Les différents acteurs de la division ne se localisent pas tous en même temps au site de division. Le déroulement de leur positionnement spatio-temporel est illustré par la figure 3.4 page 74 représentant les profils de localisations des acteurs majeurs de l'élongasome (PBP1a, PBP2b) et du divisome (PBP2x).

Au stade de division 1, l'anneau Z est correctement positionné grâce à MapZ et la ségrégation du chromosome (cf page 68). D'autre part, les protéines de la division impliquées dans les synthèses périphérique (PBP1a, PBP2b) et septale (PBP2x) sont présentes au site de division et synthétisent le PG (FL-V).

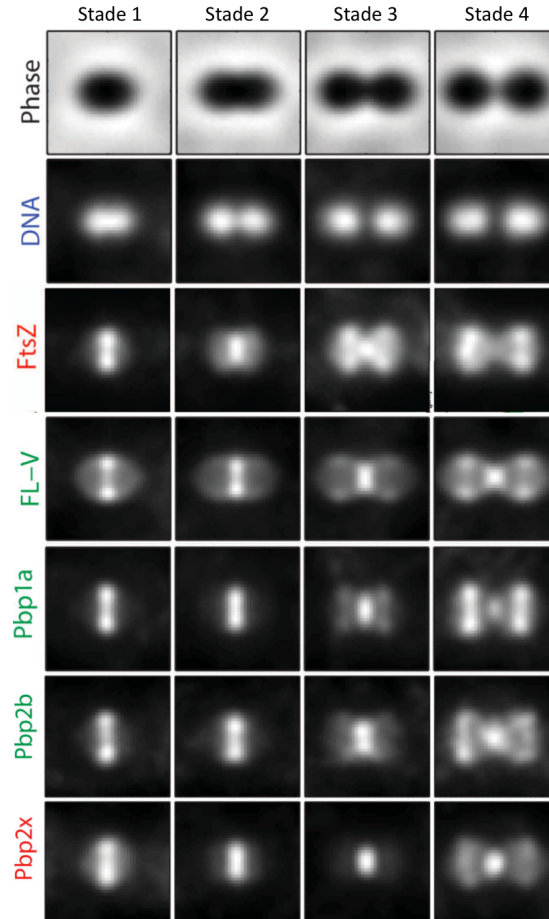
Au stade 2, la constriction de l'anneau Z débute et FtsZ commence à quitter le site de division parental pour s'assembler au niveau de l'anneau équatorial des cellules filles correspondant au futur site de division.

Cette relocalisation est plus visible au stade 3, en fin de constriction. FtsZ est alors présent à la fois aux sites de division parental et des cellules filles. Les protéines de l'élongasome (PBP1a, PBP2b) se relocalisent alors aux nouveaux sites de division et synthétisent du nouveau PG.

Seule PBP2x impliquée dans la synthèse périphérique n'est pas encore présente aux sites de division des cellules filles, et se relocalise au stade 4 lorsque la constriction et la synthèse de PG au site parental est presque terminée.

En fin de cycle, lorsque la synthèse septale du PG est achevée au site parentale, toutes les protéines de la division sont exclusivement présentes aux nouveaux sites de synthèse des cellules filles (retour au stade 1).

D'autres acteurs interviennent dans l'étape de séparation des cellules filles. FtsE/FtsX forment un complexe qui active PcsB, une hydrolase du PG interve-



**FIGURE 3.4** – Localisation de FtsZ, du site de synthèse du PG marqué par la vancomycine fluorescente (FL-V), des PBP active dans la synthèse périphérique (PBP1a, PBP2b) et septale (PBP2x) du PG au cours des différents stades de la division de *S. pneumoniae*. Les images correspondent à des reconstructions à partir des moyennes d'images de contraste de phase ou de microscopie à fluorescence. Les localisations des protéines ont été réalisées par immunofluorescence en utilisant des souches exprimant les protéines fusionnées à un tag -HA ou -FLAG. Figure composée à partir des données de LAND et al., 2013; TSUI et al., 2014.

nant lors de la septation (SHAM et al., 2011; SHAM et al., 2013; BAJAJ et al., 2016). LytB (cf 2.1.4.3 page 46) est une CBP ancrée sur les TA au niveau des pôles cellulaires et qui hydrolyse le PG afin de séparer les cellules filles à la fin du cycle de division.

## 3.2 Régulation de la division

L'intégrité du PG et le maintien de la forme cellulaire requièrent l'action coordonnée des enzymes de synthèse du PG et des protéines de la division qui se traduit par la régulation de leur localisation, leurs interactions et leur activité. Ces mécanismes de régulation sont encore peu connus mais impliquent au moins les protéines DivIVA, GpsB, StkP et PhpP.

### 3.2.1 Les régulateurs globaux StkP et PhpP

La sérine/thréonine kinase membranaire StkP et sa phosphatase apparentée PhpP se localisent aux sites de division. StkP possède un domaine extracellulaire composé de quatre motifs PASTA capables de se fixer sur le PG (YEATS, FINN et BATEMAN, 2002; MAESTRO et al., 2011; MORLOT et al., 2013). Ces domaines extracellulaires de fixation au PG et le domaine cytoplasmique kinase sont tous deux nécessaires à la localisation de StkP au milieu de la cellule pour que celle-ci intervienne de façon efficace dans le processus de division (BEILHARZ et al., 2012; FLEURIE et al., 2012). StkP se positionne au site de division de façon coordonnée à DivIVA, postérieurement à FtsA et de manière prolongée (BEILHARZ et al., 2012). StkP et PhpP sont responsables de la coordination de la croissance et de la division cellulaire probablement par la phosphorylation réversible des protéines de la division (FLEURIE et al., 2012; BEILHARZ et al., 2012; GRANGEASSE, 2016). StkP pourrait signaler le statut de la paroi aux autres protéines de la division et être nécessaire pour passer de la synthèse périphérique à la synthèse septale du PG.

Parmi les protéines phosphorylées, FtsZ a été identifiée comme substrat de StkP dans un test *in vitro*. Le régulateur de FtsZ, FtsA a été détecté dans le phosphorprotéome du pneumocoque et pourrait donc être phosphorylé par StkP (GIEFING et al., 2010; BEILHARZ et al., 2012; SUN et al., 2010). StkP est capable de phosphoryler *in vitro* GIM et MurC, deux enzymes catalysant des étapes essentielles de la synthèse du précurseur du PG, cependant le rôle de cette modification dans la bactérie n'a pas été étudié (FALK et WEISBLUM, 2013; NOVÁKOVÁ et al., 2005). StkP phosphoryle aussi les protéines de la division DivIA et MapZ respectivement

nécessaires à l'élongation et au positionnement correct du site de division (FLEURIE et al., 2014b; FLEURIE et al., 2014a; HOLEČKOVÁ et al., 2014).

Le rôle de StkP s'étend au-delà de la phosphorylation. Le domaine PASTA interagissant avec le PG est aussi nécessaire à la localisation au milieu de la cellule des protéines de la machinerie de synthèse du PG comme PBP2x (MORLOT et al., 2013). En effet, un des noeuds majeurs de cette régulation implique PBP2x, l'acteur essentiel de la synthèse septale de PG et son interaction avec StkP (FLEURIE et al., 2012; MORLOT et al., 2013). PBP2x se positionne au septum avec PBP1a et StkP. La localisation au milieu de la cellule de PBP2x est indépendante de son domaine transpeptidase mais dépend de ses domaines PASTA (PETERS et al., 2014).

Outre sa fonction de régulation de la division, StkP agit aussi comme un régulateur global de l'expression génique chez le pneumocoque. L'étude de l'expression du génome entier dans un mutant  $\Delta$ stkP montre que StkP contrôlerait la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme de la paroi, la biosynthèse de la pyrimidine, la réparation de l'ADN, l'import de fer, la réponse au stress oxydatif et la compétence (SASKOVÁ et al., 2007). La délétion de StkP induit aussi une diminution de l'expression des hydrolases du PG LytB et PcsB (BAI et al., 2014; BARTUAL et al., 2014).

### 3.2.2 DivIVA et GpsB

DivIVA et GpsB sont des protéines paralogues simultanément présentes au site de division et aux pôles (FADDA et al., 2007; FLEURIE et al., 2014a).

DivIVA est importante pour la formation et la maturation des pôles cellulaires et serait impliquée dans l'élongation (FADDA et al., 2007). Elle interagit avec elle-même, GpsB, FtsZ, FtsA, ZapA, EzrA et PcsB. GpsB colocalise avec FtsZ au site de division (LAND et al., 2013) et coordonne les synthèses périphérique et septale du PG (MASSIDDA et al., 1998). GpsB formerait un complexe avec EzrA, StkP, PBP2a, PBP2b et MreC. Elle est nécessaire à la phosphorylation des substrats par StkP dont DivIVA (FLEURIE et al., 2014a) et régulerait négativement la synthèse périphérique par PBP2b et positivement la fermeture de l'anneau Z par son interaction avec StkP-PBP2x (LAND et al., 2013; RUED et al., 2017).

Ainsi, DivIVA, GpsB et StkP fonctionnerait comme un "switch" moléculaire entre la synthèse périphérique et septale du PG (revue : GRANGEASSE, 2016).

### 3.3 Rôle des TA dans la division et la morphogenèse

Chez *S. pneumoniae*, les TA semblent jouer un rôle important dans la morphogenèse mais les mécanismes impliqués restent très peu compris.

Chez d'autres bactéries il a été montré qu'ils jouent un rôle important dans la morphogenèse et la division. Les mutants des WTA de *B. subtilis* sont affectés dans l'élongation cellulaire (D'ELIA et al., 2006b), et la division est anormale dans des mutants des LTA (SCHIRNER et al., 2009). Le blocage de la synthèse des WTA chez *S. aureus* induit d'important défauts dans la division et la séparation des cellules (CAMPBELL et al., 2011).

Chez *B. subtilis*, les protéines impliquées dans la synthèse des TA ont la même localisation que le PG néosynthétisé au site de division (FORMSTONE et al., 2008; SCHIRNER et al., 2009). Ces résultats suggèrent que leur synthèse est couplée à la division cellulaire.

Les machineries de synthèse des TA et du PG sont probablement liées et co-régulées. Un réseau complexe d'interactions impliquant des gènes tag impliqués dans le métabolisme des TA, et les gènes *mreCD* responsables de l'organisation spatiale de la synthèse du PG ont été découverts chez *B. subtilis*. Les résultats montrent que l'export des WTA est effectué par un complexe composé plusieurs enzymes et probablement associé à la machinerie de synthèse du PG (FORMSTONE et al., 2008). Les protéines impliquées dans la synthèse des LTA chez *S. aureus* interagissent avec certaines des protéines de la division et de la synthèse du PG, probablement du fait que les voies de biosynthèse des TA et du PG sont reliées par l'utilisation commune du lipide C55-undecaprenol (D'ELIA et al., 2009; CAMPBELL et al., 2011). Enfin les WTA de *S. aureus* agissent comme régulateur temporel et spatial du métabolisme du PG en contrôlant le niveau de réticulation du PG et en localisant PBP4 au site de division (ATILANO et al., 2010; GAUTAM et al., 2015).

Chez *Streptococcus pneumoniae*, la localisation de protéines des machineries de synthèse du PG et des TA montrent qu'elles se localisent au site de division (cf chapitre 2.1.2.1 page 31), mais à ce jour, aucune donnée n'est publiée concernant un potentiel couplage de la machinerie de biosynthèse des TA avec les machineries de synthèse septale et/ou périphérique du peptidoglycane.

La coopération des deux machineries dans la division intervient aussi au niveau de la régulation de l'hydrolyse du PG. Chez *Bacillus subtilis*, la séparation cellulaire dépend du clivage du PG par des DL-endopeptidases. La localisation aux sites de

séparation et aux pôles des bactéries de LytF qui se fixe sur le PG est inhibée par les WTA (YAMAMOTO et al., 2008) et les LTA (KIRIYAMA et al., 2014). L'expression et la localisation de LytE qui intervient dans l'hydrolyse de la paroi latérale durant l'élongation sont affectées par les TA. (KASAHARA et al., 2016). Ces résultats montrent que chez *B. subtilis* les LTA et WTA sont importants dans la régulation de l'hydrolyse du PG.

Chez *Staphylococcus aureus*, l'autolysine bifonctionnelle Atl se localise dans la région septale où elle hydrolyse le PG permettant la séparation correcte des cellules. La position de Atl est aussi régulée par les WTA qui empêchent sa fixation à la paroi parentale mais pas au site de division ce qui permet la séparation des cellules filles (SCHLAG et al., 2010). Enfin, les WTA de *S. aureus*, de part leur charge en protons, seraient capables de créer un environnement local acide qui régule l'activité dépendante du pH des autolysines telle que AtlA (BISWAS et al., 2012).

Ces données indiquent que les TA participent aux mécanismes de la morphogénèse bactérienne par le contrôle du remodelage du PG en dirigeant la localisation subcellulaire d'enzymes clés de l'hydrolyse du PG. Cependant, il n'est pas connu si les enzymes d'hydrolyse du PG sont régulés par les TA par interactions directes avec ces structures ou indirectes via des mécanismes de régulation impliquant d'autres protéines. Chez *S. pneumoniae*, les TA contrôlent une partie de l'activité d'hydrolyse du PG par le support direct des CBPs dont plusieurs sont des hydrolases du PG qui ont des rôles importants pour la physiologie bactérienne dans la séparation des cellules filles (LytB) et différents mécanismes de lyses (LytA, LytC, CbpD). Cette thématique sera abordée dans la publication 8 157 qui étudie le rôle des TA dans la régulation de LytA.

Pour conclure, bien que la composition chimique et la biosynthèse des TA soient partiellement décrites et que leur importance pour la physiologie cellulaire bien établie, la régulation de leur synthèse, leur composition et leur organisation tridimensionnelle à la surface bactérienne au cours du cycle cellulaire reste très peu comprise. La rareté des données vient principalement du manque d'outils appropriés à leur étude. Une des stratégies pour étudier le rôle des TA dans la division, la morphogénèse et comprendre comment ils guident le positionnement des hydrolases du PG, peut être d'étudier si les TA ont une localisation particulière à la surface bactérienne, qui concorderait avec la localisation des machineries de synthèse et celle des hydrolases. Cependant, le marquage des TA a été uniquement réalisé en utilisant

la concanavoline A, une lectine qui se fixe au glucose ou mannose mais qui induit l'agrégation des cellules et un marquage peu efficace dont une partie est non spécifique (SCHLAG et al., 2010; ANDRE et al., 2011). Le chapitre suivant décrit une nouvelle technique innovante de marquage métabolique par utilisation de la chimie click qui a permis de marquer spécifiquement les TA de *S. pneumoniae* et d'étudier leur biosynthèse *in vivo*.





# 4

## Marquage métabolique et chimie click

### Sommaire

---

4.1 Principe . . . . .	82
4.2 Applications . . . . .	86

---

## 4.1 Principe

L'étude des biomolécules dans leur environnement physiologique est un réel défi aussi bien pour les organismes eucaryotes que les procaryotes, du fait de la complexité des systèmes cellulaires et de la difficulté à marquer spécifiquement une seule structure.

L'immunomarquage est une technique largement utilisée pour détecter et localiser des composants cellulaires exposés en surface ou intracellulaires. Cette technique permet de marquer des molécules codées génétiquement ou non, sous condition de disposer d'anticorps ciblant soit directement la molécule d'intérêt, soit une étiquette fusionnée à cette molécule. Cependant, l'inconvénient majeur est qu'elle requiert en général la fixation chimique, voir la perméabilisation des membranes par des détergents, ce qui altèrent la structure de la surface cellulaire et ne permet pas d'observer des cellules vivantes, un paramètre essentiel à la compréhension des fonctions biologiques des molécules dans un environnement physiologique.

Au cours de la dernière décennie, le développement de protéines fluorescentes codées génétiquement telle que la GFP (Green Fluorescent Protein) (NIENHAUS, 2008), suivie par d'autres protéines présentant un large spectre de propriétés de fluorescence, fusionnées aux protéines d'intérêt, a révolutionné l'étude de nombreux mécanismes physiologiques en permettant la localisation et/ou colocalisation *in vivo* des protéines.

La détection et la localisation de biomolécules non codées génétiquement, tels que les polymères de sucres présents à la surface cellulaire, est un champ d'investigation ardu car les techniques de génie génétique ne peuvent être exploitées pour effectuer des marquages *in vivo*. Cependant, un nouveau domaine de recherche intégrant des outils chimiques en biologie cellulaire se développe depuis plusieurs années afin de relever ce défi. Des techniques ont été développées pour modifier la surface cellulaire avec des composants synthétiques permettant de marquer spécifiquement des structures biologiques dans des cellules vivantes (GAUTAM et al., 2013). Ces techniques peuvent être appliquées au marquage des carbohydrates, acides nucléiques, lipides et protéines; dans ce dernier cas, ces approches se révèlent plus intéressantes que la fusion avec des protéines fluorescentes quand il est nécessaire de marquer un site spécifique d'une protéine (ZHANG et al., 2015).

La stratégie permettant de présenter des petites molécules d'intérêt à la surface bactérienne est basée sur leur incorporation métabolique. La molécule chimiquement modifiée est ajoutée de manière exogène dans la culture, la cellule l'incorpore par

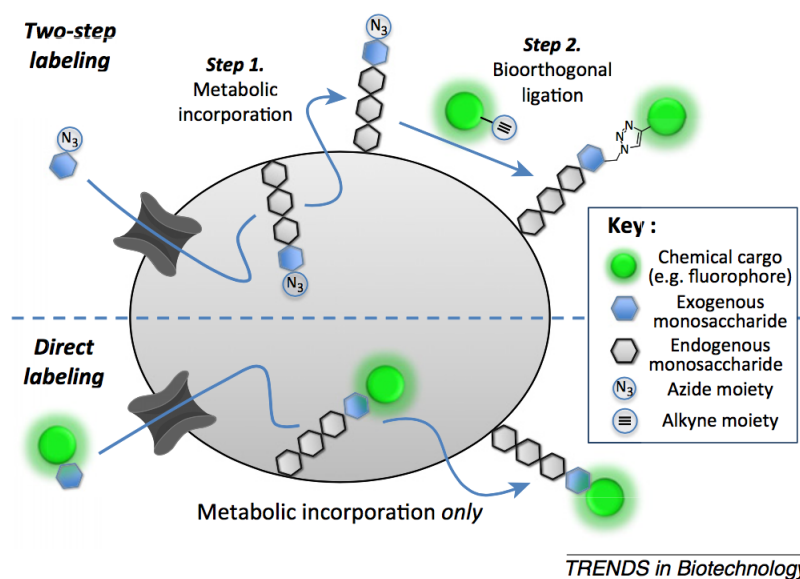
la machinerie appropriée pour être ensuite métabolisée et incorporée dans la paroi cellulaire.

Le marquage peut être direct ou indirect (Figure 4.1 page 84). Dans le cas d'un marquage direct, le métabolite d'intérêt est couplé à un groupement marqué, un fluorophore par exemple, qui est directement intégré avec la molécule (Figure 4.1 partie inférieure). Cependant, cette méthode peut se révéler infructueuse du fait de la taille importante du groupement marqué empêchant la métabolisation correcte de la molécule. Dans ce cas, la stratégie indirecte de chimie click, qui consiste en un marquage en deux étapes, est plus appropriée (Figure 4.1 partie supérieure).

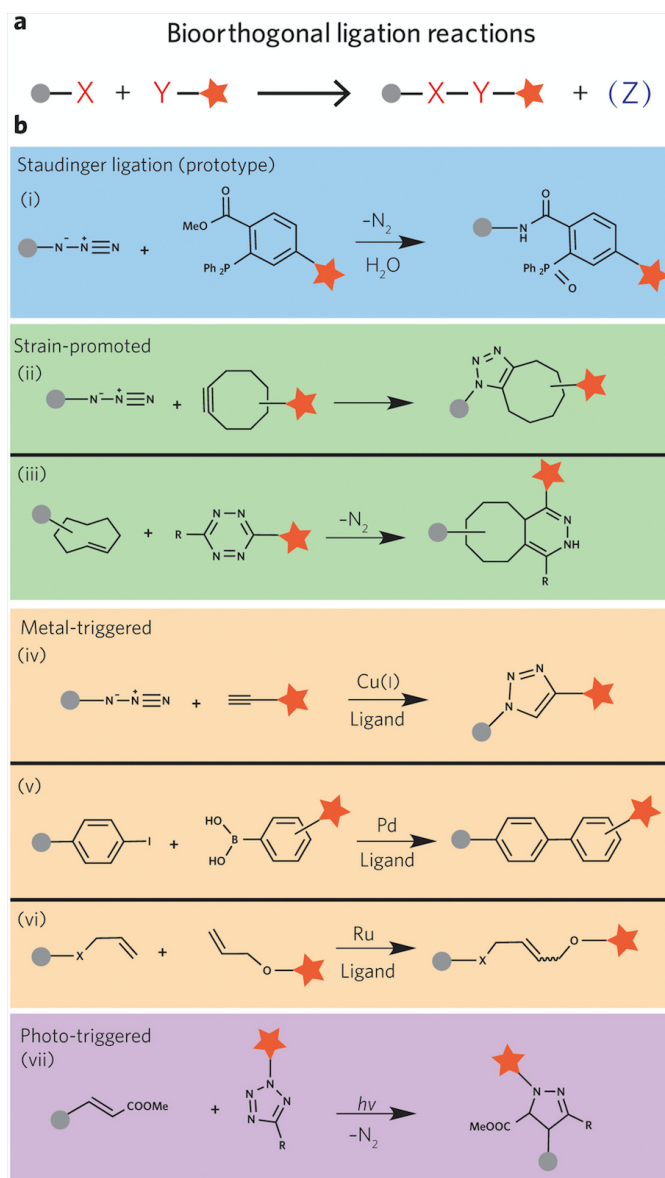
L'élément clé de cette approche est l'utilisation des réactions chimiques bioorthogonales (chimie click) dont les composants réagissent rapidement et sélectivement sans interférer avec les processus biologiques, dans des conditions environnementales physiologiques. Dans le cas de marquage métabolique de structures de surface, la molécule d'intérêt est modifiée afin de posséder un petit groupement chimique réactif, comme un azoture ou un alcyne, auquel se lie bio-orthogonalement, après métabolisation et exposition à la surface cellulaire, un fluorophore-alcyne ou -azoture (Figure 4.1 page 84 partie supérieure).

Différentes réactions ont été développées au cours des années et leurs propriétés cinétiques améliorées (Figure 4.2 page 85). De nombreuses revues résument ces avancées et leur applications biologiques (SLETTEN et BERTOZZI, 2009 ; RAMIL et LIN, 2013 ; LANG et CHIN, 2014 ; PATTERSON, NAZAROVA et PRESCHER, 2014 ; MCKAY et FINN, 2014 ; THIRUMURUGAN, MATOSIUK et JOZWIAK, 2013 ; BORRMANN et al., 2014 ; YANG, LI et CHEN, 2014 ; SPICER et DAVIS, 2014 ; LI et ZHANG, 2016)).

La réaction de chimie click classique implique la formation catalysée par le cuivre, d'un triazole à partir d'un azoture et d'un alcyne, et se nomme Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) (Figure 4.2 page 85, réaction iv) (pour revue : LI et ZHANG, 2016). Les groupements azoture et alcyne sont interchangeable, l'un ou l'autre peut être mis sur la molécule d'intérêt ou utilisé pour la détection, ces groupements étant biologiquement uniques, inertes et stables. Cette technique a été utilisée dans la publication présentée chapitre 6 page 125. Cependant, l'utilisation de cuivre induit une cytotoxicité qui empêche son utilisation prolongée sur des cellules vivantes. Afin de surmonter ce problème, différentes techniques ont été développées (pour revue : LI et CHEN, 2016) dont des réactions plus efficaces et rapides comme l'Inverse electron-demand Diels-Alder (IED-DA) (Figure 4.2 page 85, réaction iii), l'utilisation de ligands réduisant la toxicité du cuivre et augmentant sa réactivité



**FIGURE 4.1 – Schéma représentatif des méthodes de marquage en deux étapes ou direct.** Ce schéma montre un exemple d'intégration d'un dérivé monosaccharide (bleu), incorporé métaboliquement dans les oligosaccharides synthétisés (gris), et exporté à la surface cellulaire. Dans le cas d'un marquage en deux étapes (partie supérieure), le monosaccharide est modifié avec un groupement chimique azoture (azide moiety), auquel un fluorophore possédant un groupement alcyne (alkyne moiety) peut se fixer bioorthogonalement à la surface bactérienne. Dans le cas d'un marquage direct (partie inférieure), le cargo chimique (ici un fluorophore vert) est directement attaché sur le monosaccharide et la molécule entière est métabolisée par la bactérie. Source : GAUTAM et al., 2013.



**FIGURE 4.2 – Représentation des réactions de ligation bioorthogonale.** **a.** La réaction chimique bioorthogonale repose sur la ligation de deux composants (X et Y) avec ou sans produit secondaire en fonction de la réaction (Z). **b.** Différentes réactions de ligation bioorthogonales ont été développées, les réactions types sont présentées et classées en fonction de l'élément nécessaire à la réaction. i, Ligation Staudinger (prototype); ii, Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition (SPAAC); iii, Inverse Electron-Demand Diels-Alder Reaction (IEDDA); iv, Copper-Mediated Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC); v, Palladium-Mediated Suzuki cross-coupling; vi, Ruthenium-Mediated Olefin Metathesis; vii, Photo-triggered click reaction. Source : LI et CHEN, 2016.

(MCKAY et FINN, 2014), l'utilisation d'autres métaux que le cuivre (Figure 4.2, réactions v et vi), le développement de réactions bioorthogonales utilisant d'autres groupements (Figure 4.2, réaction vii) et enfin le développement d'une technique sans cuivre nommée Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition (SPAAC) qui a significativement amélioré la biocompatibilité de la chimie click (Figure 4.2, réaction ii). C'est cette dernière technique qui a été utilisée dans les résultats présentés dans le chapitre 7 page 151 et la troisième publication chapitre 8 page 157.

## 4.2 Applications

Les polymères de glycanes de la paroi bactérienne comprennent le PG, les TA (chez les bactéries à Gram positif), la capsule polysaccharidique, les glycolipides et les glycoprotéines. Certains de ces polymères ont été marqués avec succès par marquage métabolique associé à la chimie click :

### - Le lipopolysaccharide (LPS).

Le lipopolysaccharide est un glycolipide qui constitue la majorité de la face externe de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Après modification de la voie de synthèse du L-fucose pour rendre *E. coli* dépendante du L-fucose exogène (un composant de l'antigène O), il a été possible d'introduire un L-fucose fonctionnalisé avec un groupement azoture dans les LPS et de le détecter avec un dérivé alkynyl-fluorescéine par chimie click (YI et al., 2009). Une stratégie comparable a été utilisée en utilisant un dérivé d'un sucre KDP (un composant du coeur de l'oligosaccharide) chez *E. coli* et d'autres bactéries à Gram négatif (DUMONT et al., 2012). L'ingénierie chimique des sucres a été étendue aux glycoprotéines des bactéries de la classe des Bacteroidales comme *Helicobacter pylori* et *Campylobacter jejuni* (BESANCENEY-WEBLER et al., 2011 ; KOENIGS, RICHARDSON et DUBE, 2009 ; LIU et al., 2009).

### - Les glycolipides.

Bien que les mycobactéries soient classifiées comme étant des bactéries à Gram positif, elles possèdent une couche polysaccharidique surmontant le PG et composée d'arabinogalactane, une couche d'acides mycoliques dans laquelle les lipides de surface sont intercalés en trehalose dimycolate (TDM). Les TDM ont un intérêt clinique dans la pathogenèse des mycobactéries et ont été utilisés pour le marquage métabolique. La fluoroscéine a été greffée en utilisant une stratégie de marquage en deux étapes et a permis la détection de *Mycobacterium tuberculosis* en culture mais aussi à l'intérieur du phagosome de macrophages infectés (BACKUS et al., 2011). Une nou-

velle méthode de marquage par incorporation métabolique d'azidos pentoses dans la paroi a prouvé son efficacité pour marquer des isolats cliniques sans influencer la maturation phagosomale lors de l'infection de macrophages humains (KOLBE et al., 2017).

#### - Le peptidoglycane.

Depuis les premiers développements dans les années 2000, la majorité des applications des marquages chimiques ont été dédiés à l'incorporation de molécules non natives dans le PG. Une stratégie indirecte en deux étapes a été utilisée pour marquer les monomères de pentapeptide MurNAc modifiés avec un groupement ketone qui ont été incorporés dans le PG de bactéries à Gram positif et négatif puis détecté avec des fluorophores fonctionnalisés avec un groupement hydrazide (REIKO SADAMOTO et al., 2002; SADAMOTO et al., 2004). Des approches chimiques similaires ont été réalisées sur le précurseur des GlcNAc chez les bactéries à Gram positif (SADAMOTO et al., 2008). Une version modifiée du tripeptide L-alanyl-g-D-glutamyl-L-lysine fuisonné à la fluorescéine a aussi été incorporée dans le PG, cette technique de marquage directe a permis de visualiser en vidéo-microscopie la synthèse du PG et son renouvellement durant la croissance et la division d'*E. coli* (OLRICHS et al., 2011).

Une réaction de transpeptidation différente de celle catalysée par les PBP a été décrite qui permet le remplacement des D-alanine terminales par des D-acides aminés présents dans le milieu (CAVA et al., 2011). Cette observation a été exploitée afin d'utiliser des variants C-terminaux non natifs comme substrat de la réaction de transpeptidation afin d'être intégrés dans le PG. Plusieurs études ont ainsi montré que la machinerie de biosynthèse de la paroi tolère et incorpore des acides aminés de configuration D fonctionnalisés avec une petite fonction chimique comme un alcyne ou un azoture, mais aussi des groupements plus encombrants comme un fluorophore (KURU et al., 2012; PIDGEON et al., 2015). Les résultats montrent que l'incorporation de D-acides aminés fluorescents a lieu spécifiquement au site de biosynthèse de la paroi. De plus, l'assimilation de D-acides aminés marqués dans des expériences de "pulse chase" peut être suivie en temps réel et a permis l'analyse dynamique de la synthèse de la paroi chez des bactéries de morphologies variées (KURU et al., 2012). Cette technique a été utilisée dans les publications présentées chapitre 5 page 93 et chapitre 8 page 157.

Une autre approche impliquant la modification directe de la paroi de la bactérie à Gram positif *S. aureus* a été développée en exploitant la fonction de la sortase A,



une enzyme qui accroche de façon covalente des protéines sur le PG (NELSON et al., 2010).

#### **- Les acides téichoïques.**

En dépit de leur rôle important dans les processus physiopathologiques des bactéries à Gram positif, la localisation et la dynamique de la biosynthèse des TA demeurent des processus encore très peu étudiés de par l'absence d'outils appropriés. Au laboratoire, nous avons utilisé la technique de chimie click pour répondre à ces questions. Une technique de marquage métabolique a été développée afin de marquer spécifiquement les TA de *S. pneumoniae*. Ces résultats sont présentés dans la deuxième publication chapitre 6 page 125, le chapitre 7 page 151 et la troisième publication chapitre 8 page 157.

Pour conclure, le marquage métabolique de la surface bactérienne a d'ores et déjà permis de révéler différents mécanismes de la physiologie bactérienne, en particulier ceux concernant les mécanismes de croissance et division grâce au marquage du PG. De plus, cette technique offre de potentielles applications transversales en biotechnologie et biomédecine notamment pour la détection spécifique de bactéries pathogènes et la découverte de nouvelles cibles antibiotiques (CLARK et al., 2016).

## Problématique

Malgré les vaccins et l'importante utilisation des antibiotiques, *Streptococcus pneumoniae* reste un pathogène majeur. Il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies afin de contrôler et réduire les infections et la résistance aux antibiotiques. Le pré-requis essentiel est la compréhension de la physiologie et des mécanismes de virulence de la bactérie.

L'interaction avec l'hôte est principalement médiée par les composants présents à la surface bactérienne : la capsule polysaccharidique, la paroi et les protéines de surface. Ce travail se concentre sur l'étude des deux composants de la paroi cellulaire, le peptidoglycane (PG) et les acides téichoïques (TA).

La O-acétylation du PG par Adr est un mécanisme de remodelage impliquée dans la résistance au lysozyme et aux antibiotiques. L'étude du rôle de la O-acétylation du PG dans la physiologie bactérienne, jusqu'à maintenant inconnu, fait l'objet de la première publication présentée dans le chapitre 5 page 93.

La O-acétylation a lieu sur le carbone 6 du MurNAc au niveau duquel sont aussi ancrés les TA. Ces polysaccharides sont essentiels à la bactérie aussi bien au niveau de la morphogénèse que de la virulence, mais les mécanismes de leur synthèse et leur régulation restent peu compris du fait du manque d'outils appropriés à leur étude. La deuxième publication présentée chapitre 6 page 125 ainsi que les résultats du chapitre 7 page 151 décrivent une technique de marquage métabolique des TA *in vivo* qui a permis leur localisation à la surface bactérienne.

Cette méthode ouvre le champ à l'étude des interactions entre les machineries de synthèse des TA et du PG et à leur rôle dans le remodelage du PG en recrutant et positionnant de façon appropriée dans le temps et l'espace des hydrolases du PG durant le cycle cellulaire. Ce dernier point est l'objet de la troisième publication présentée chapitre 8 page 157.



# Deuxième partie

## Résultats



# 5

Peptidoglycan O-acetylation is functionally related to cell wall biosynthesis and cell division in *Streptococcus pneumoniae*

## Sommaire

---

<b>5.1</b>	<b>Contexte</b>	<b>94</b>
<b>5.2</b>	<b>Publication</b>	<b>95</b>
5.2.1	Résumé	96
5.2.2	Introduction	98
5.2.3	Methods	100
5.2.4	Results	105
5.2.5	Discussion	120

---

## 5.1 Contexte

Le PG, souvent considéré comme un polymère rigide, est en fait une structure très dynamique continuellement remodelée par des enzymes hydrolytiques et des modifications chimiques. Cependant, l'activité non contrôlée de ces hydrolases pourrait conduire à la lyse bactérienne. Il est donc impératif de la part des bactéries de disposer de moyens de régulation de l'activité des hydrolases du PG.

Un tel exemple de contrôle est illustré chez le pneumocoque par LytA. Cette hydrolase est l'autolysine majeure responsable de l'autolyse en fin de phase stationnaire de croissance. Il a été précédemment montré que LytA n'est active que sur les cellules dont la croissance est arrêtée : en phase stationnaire ou dont la synthèse du PG est inhibée par des antibiotiques. Les cellules en cours de croissance (pendant la phase exponentielle) présentent ainsi une sorte d'immunité contre l'action lytique de LytA. Nous avons cherché à identifier quel(s) serai(en)t le(s) facteur(s) impliqué(s) dans ce processus de protection.

L'acétylation des chaînes glycanes du PG est une stratégie commune développée par les bactéries pathogènes pour échapper à la lyse induite par le lysozyme produit par le système immunitaire inné de l'hôte. Deux types de modifications chimiques régulant le niveau d'acétylation des chaînes glycanes du PG sont connues chez le pneumocoque : la N-déacétylation par PgdA et la O-acétylation par Adr. Nous avons donc recherché si l'une de ces modifications chimiques du PG pouvait être à l'origine de la protection vis-à-vis de l'activité hydrolytique de LytA.

Une implication d'Adr, donc de la O-acétylation du PG, a été identifiée. Les travaux présentés dans cette publication portent sur le rôle d'Adr dans la régulation de l'activité de LytA et la caractérisation de la fonction d'Adr s'est étendue au processus de division du pneumocoque.

Les résultats suggèrent qu'il y aurait un lien entre O-acétylation et réticulation du PG par les PBPs. La suite de ce travail devra viser à déterminer si le rôle d'Adr dans la synthèse de la paroi et la division implique son activité enzymatique et/ou des interactions moléculaires avec des protéines de la machinerie de division.

## 5.2 Publication

### **Peptidoglycan O-acetylation is functionally related to cell wall biosynthesis and cell division in *Streptococcus pneumoniae*.**

Bonnet J<sup>1</sup>, Durmort C<sup>1</sup>, Jacq M<sup>1\*</sup>, Mortier-Barrière I<sup>2</sup>, Campo N<sup>2</sup>, Nieuwenhze MS<sup>3</sup>, Brun Y<sup>3</sup>, Arthaud C<sup>1</sup>, Gallet B<sup>1</sup>, Moriscot C<sup>1</sup>, Morlot C<sup>1</sup>, Vernet T<sup>1</sup>, Di Guilmi AM<sup>1\*\*</sup>

Article accepté dans Molecular Microbiology le 28 Septembre 2017

DOI : 10.1111/mmi.13849

Lien vers la version publiée :

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mmi.13849/abstract>

<sup>1</sup> Institut de Biologie Structurale (IBS), Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, 38044 Grenoble, France.

<sup>2</sup> Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, Centre de Biologie intégrative (CBI), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de Toulouse, UPS, F-31000 UMR Toulouse, France.

<sup>3</sup> Departments of Biology and Chemistry, Indiana University, Bloomington, Indiana, United States of America.

\* Present address : Department of Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana, United States of America.

\*\* Present address : CEA Fontenay-aux-roses, DRF/IRCM/SIGRR/LRIG, BP6-18 route du panorama, 92265 Fontenay-aux-roses cedex, France.

e-mail : [anne-marie.di-guilmi@cea.fr](mailto:anne-marie.di-guilmi@cea.fr)



### 5.2.1 Résumé

Le peptidoglycane, l'un des composants majeur de la paroi bactérienne, est une matrice rigide essentielle pour résister à la turgescence et maintenir la forme bactérienne. Il est formé par des chaînes glycanes linéaires composées de disaccharides d'acide *N*-acetylmuramique-( $\beta$ -1,4)-*N*-acetylglucosamine (MurNAc-GlcNAc) associés par des ponts peptidiques réticulés. Le peptidoglycane nécessite un remodelage constant par des enzymes de synthèse et d'hydrolyse ainsi que par des modifications chimiques, telle que la O-acétylation des résidus MurNAc présente chez la plupart des bactéries Gram positif et négatif. La O-acétylation du peptidoglycane est une stratégie efficace développée par les pathogènes pour résister à la dégradation par le lysozyme et ainsi échapper au système immunitaire innée de l'hôte, mais peu de choses sont connues concernant la fonction de la O-acétylation du peptidoglycane dans la physiologie bactérienne.

Dans cette étude, nous avons étudié dans quelle mesure la O-acétylation du peptidoglycane est impliquée dans la biosynthèse de la paroi et la division de *Streptococcus pneumoniae*. Nous avons montré que la O-acétylation des résidus MurNAc, réalisée par Adr, protège le peptidoglycane des cellules en division du clivage des liens amides par l'autolysine majeur LytA. Ce résultat nous renseigne ainsi sur les mécanismes moléculaires de la régulation de l'activité de LytA. Nous avons mis au jour le rôle biologique de la O-acétylation des MurNAc dans la synthèse du peptidoglycane qui participe à une réticulation correcte des brins peptidiques. Enfin, nous avons montré que la O-acétylation du peptidoglycane a lieu au site septal et qu'elle est fonctionnellement reliée à la machinerie de division. Adr apparaît donc comme un acteur important de la division du pneumocoque qui promeut la formation d'un peptidoglycane robuste et mature et/ou interagit avec des composants de la machinerie de division.

### Abstract

The peptidoglycan, one of the major components of the bacterial cell wall, is a rigid matrix required to resist turgor pressure and to maintain the cellular shape. It is formed by linear glycan chains composed of *N*-acetylmuramic acid-( $\beta$ -1,4)-*N*-acetylglucosamine (MurNAc-GlcNAc) disaccharides associated through cross-linked peptide stems. The peptidoglycan is continually remodeled by synthetic and hydrolytic enzymes and by chemical modifications, including O-acetylation of MurNAc residues that occurs in most Gram-positive and Gram-negative bacteria. The peptidoglycan O-acetylation is a powerful strategy developed by pathogens to resist to

lysozyme degradation and thus to escape from the host innate immune system but little is known about the function of peptidoglycan O-acetylation in bacterial physiology. In this study, we have investigated to what extent peptidoglycan O-acetylation is involved in the process of cell wall biosynthesis and cell division of *Streptococcus pneumoniae*. We show that O-acetylation of the MurNAc residues driven by Adr protects the peptidoglycan of dividing cells from cleavage of the amide bond by the major autolysin LytA, giving thus insights into the molecular mechanisms of the regulation of LytA activity. We uncover the biological role of MurNAc O-acetylation in peptidoglycan synthesis by participating in the efficient cross-link of the peptide strands. Finally, we show that peptidoglycan O-acetylation takes place at the septal site and is functionally related to the division machinery. We propose that Adr is an important player of the pneumococcal division process that promotes the formation of robust and mature peptidoglycan and/or interacts with components of the division machinery.

## 5.2.2 Introduction

The bacterial cell wall is essential since it contributes to the maintenance of the cell shape and sustains the basic cellular processes of growth and division. It is also crucial to resist turgor pressure and provides an interface between the cell and its environment. One of the major components of the bacterial cell wall is peptidoglycan, a matrix of linear glycan chains composed of disaccharides *N*-acetylmuramic acid- $(\beta$ -1,4)-*N*-acetylglucosamine (MurNAc-GlcNAc) associated through peptide stems linked to MurNAc.

Assembly of the peptidoglycan network requires synthetic and hydrolytic enzymes. Penicillin- Binding Proteins (PBPs) and SEDS proteins (Shape, Elongation, Division and Sporulation) (MEESKE et al., 2016; EMAMI et al., 2017) polymerize the glycan chains (glycosyltransferase activity) while only PBPs cross-link the peptide strands (transpeptidation activity that is inhibited by  $\beta$ -lactam antibiotics) (for reviews on PBPs, see : SAUVAGE et al., 2008; SAUVAGE et TERRAK, 2016; EGAN et al., 2015). Endogenous peptidoglycan hydrolases cleave the peptidoglycan polymer in order to insert new material and to allow daughter cells separation and peptidoglycan maturation (VOLLMER, 2008; SMITH, BLACKMAN et FOSTER, 2000 for reviews). Peptidoglycan hydrolases are divided into different classes according to their cleavage site. *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidases hydrolyse the bond between MurNAc and L-alanine and thus separate the glycan strand from the peptide moiety. Carboxy- and endopeptidases cleave the peptidic stem. *N*-acetylglucosaminidases and *N*-acetylmuramidases cut respectively the GlcNAc-MurNAc and MurNAc-GlcNAc bonds inside the glycan chains. Lastly, lytic transglycosylases cleave the glycosidic linkage between MurNAc-GlcNAc and GlcNAc-MurNAc residues with the concomitant formation of a 1,6-anhydromuramoyl product.

Chemical modifications of the glycan strands participate to peptidoglycan remodeling. Removal of the *N*-acetyl groups is most often observed in Gram-positive bacteria and the best characterized enzyme in charge of this reaction is the *N*-acetylglucosamine deacetylase PgdA from *Streptococcus pneumoniae* (BLAIR et al., 2005). The peptidoglycan glycan chains can be acetylated also on their C6- OH groups (O-acetylation). O-acetylation of GlcNAc has only been detected in *Lactobacillus* and *Bacillus* species (LAABERKI et al., 2011; BERNARD et al., 2011). By contrast, O-acetylation of MurNAc is present in most Gram-positive and Gram-negative bacteria, with the exception of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteria (for more details see the reviews : VOLLMER, 2008; MOYNIHAN

et CLARKE, 2011). Interestingly, the cell wall of Gram-positive bacteria contains wall teichoic acids (WTA), which are glycopolymers linked to the C6-OH group of MurNAc. This indicates that WTA decoration and O-acetylation of MurNAc are mutually exclusive (BROWN, SANTA MARIA et WALKER, 2013 for review). O-acetylation of MurNAc residues is a two-step process. Firstly, the acetyl-donor is transported from the cytoplasm to the periplasm or the extracellular space. Secondly, the acetyl group is transferred to the C6-OH group. In Gram-negative bacteria, these steps are performed by two different proteins : the integral membrane protein PatA transports the acetyl-donor and the inner membrane-anchored protein PatB catalyzes the acetylation reaction (MOYNIHAN et CLARKE, 2010). Conversely, in Gram-positive bacteria, these functions are held by a single protein, OatA, formed by two domains : the N-terminal domain composed by 11 transmembrane helices that supposedly transfers the acetyl group to the C- terminal domain exposed in the extracellular space, which in turn catalyzes the O-acetylation of MurNAc (BERA et al., 2005).

In many bacteria including important human pathogens like *S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria gonorrhoeae* and *N. meningitidis*, N-deacetylation and/or O-acetylation of MurNAc and GlcNAc residues were shown to provide resistance to lysozyme, a N- acetylmuramidase enzyme found in human tears, saliva, or gastrointestinal tract (CALLEWAERT et MICHIELS, 2010, for review : DAVIS et WEISER, 2011). The substratebinding site of lysozyme involves amino acids residues that interact with acetyl groups as well as residues lining the active site that recognize C6-OH groups of MurNAc (VOCADLO et al., 2001 ; BLAKE et al., 1965). By consequence, acetylation of the glycan residues causes a steric hindrance that reduces the affinity of lysozyme for the C6-OH groups (MOYNIHAN et CLARKE, 2011).

In Gram-negative bacteria, PG O-acetylation is also involved in lysozyme resistance, cell wall metabolism, pathogenesis ((MOYNIHAN et CLARKE, 2011 ; MOYNIHAN, SYCHANATHA et CLARKE, 2014) for reviews) and has also been shown to have a role in biofilm formation in *Campylobacter jejuni* (IWATA et al., 2016). The genes cluster encoding PatA and PatB also encodes an O-acetylpeptidoglycan esterase, Ape responsible for O-acetyl group removal. PatA/PatB and Ape function together to regulate the lytic transglycosylase activity of autolysins involved in PG metabolism, which would be a means to localize their activity (WEADGE et CLARKE, 2005 ; WEADGE, PFEFFER et CLARKE, 2005). This genes cluster is also present in some

Gram-positive bacteria from the *Bacillus* genus (WEADGE, PFEFFER et CLARKE, 2005) and play a role in cell division and anchoring of S-layer to the cell surface (LAABERKI et al., 2011). However, Gram-positive bacteria which O-acetylate their PG only by OatA homologs do not possess O-acetylpeptidoglycan esterase.

Beside the importance of peptidoglycan O-acetylation as a molecular determinant in the interaction with the host organism, little is known about the function of this modification in bacterial physiology. In this work, we have investigated the role of peptidoglycan O-acetylation in the peptidoglycan resistance to endogenous hydrolases, peptidoglycan synthesis and cell division. This question has been addressed in the context of the human pathogen Gram-positive bacterium *S. pneumoniae* in which peptidoglycan O-acetylation is performed by the homologous of OatA named Adr (Attenuated drug resistance), since the absence of Adr resulted in the loss of peptidoglycan O-acetylation CRISOSTOMO et al., 2006. Here, we showed that peptidoglycan O-acetylation protects growing pneumococcal cells from lysis induced by LytA. In addition, we demonstrate that peptides cross-links and O-acetylation are peptidoglycan maturation processes functionally related and that Adr is also tightly connected to the cell division machinery.

### 5.2.3 Methods

**Plasmid construction and site-directed mutagenesis.** The construction of pJBadr construction required intermediate steps performed as follows. pCM38 (JACQ et al., 2015) derives from pJWV25 (EBERHARDT et al., 2009) that contains a AgeI/SpeI cassette encoding the GFP+ under the control of the PczcD promoter [bgaA : :PZn-gfp+] (AmpR, TetR). The gene encoding the superfolder GFPop was digested by AgeI and SpeI from pCM83 and the fragment was inserted into pCM38 between AgeI and SpeI [bgaA : :PczcD-sfGFPop]. Insertion of the BssHII and BsiWI restriction sites was performed by PCR-based site-directed mutagenesis upstream of the AgeI restriction site in pCM83 and results in pADG0. pADG02 corresponds to pADG0 from which the sfGFPop gene was removed by PCR-based site-directed mutagenesis [bgaA : :PczcD]. The *adr* gene was amplified by PCR with FORoJB57 and REVoJB58 primers, digested by BssHII and BsiWI and inserted into pADG02 between BssHII and BsiWI [bgaA : :PczcD-*adr*] to generate pJBadr. Mutations were introduced by PCR-based site-directed mutagenesis and verified by DNA sequencing (Beckman Coulter Genomics, Genewiz).

**Bacterial strains and plasmids.** The strains, plasmids, and oligonucleotide primers used are listed in Table 1 p.103. The synthetic gene encoding the superfol-

der variant of GFP (sfGFPop) was optimized for expression in *S. pneumoniae* and ordered from GeneArt (Invitrogen). Allelic replacements were performed using the Janus method, a two-step procedure based on a bicistronic kan-rpsL cassette called Janus (SUNG et al., 2001). This method avoids polar effects and allows expression of the fusion proteins at physiological levels.

**Protein expression and purification.** Strain BL21(DE3) Rosetta pLysS Rare (CmR) of *E. coli* was transformed with the plasmid pET28-His-LytA (KanR) (PHILIPPE et al., 2015) or pET28-His-LytAE87Q (KanR). Cells were grown in Luria Bertani medium and protein expression was induced at OD<sub>595nm</sub> 0.6 with 0.5 mM IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) at 25°C overnight. Cells from 2-litres cultures were harvested by centrifugation, resuspended in 50 ml of a buffer containing 50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 25 mM imidazole, 10% glycerol and a protease inhibitor cocktail (Complete EDTA free, Sigma-Aldrich) and lysed using a Microfluidize M-110P (Microfluidics). The lysate was clarified by centrifugation (20 min at 39,191 x g at 4°C) and loaded onto a 10-ml Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) column (Qiagen). His-LytA proteins were eluted with a 25 mM to 500 mM imidazole gradient. Pooled fractions were concentrated and further purified by size exclusion chromatography using a Superdex S75 10/300 GL column (GE Healthcare) in 25 mM Tris-HCl (pH 8) and 150 mM NaCl.

**Growth conditions, media, and transformation.** Liquid cultures of *S. pneumoniae* strains were grown at 37°C/5%CO<sub>2</sub> in C medium supplemented with 0.5% yeast extract (LACKS et HOTCHKISS, 1960) (CY) or in Todd Hewitt medium (TH; BD Sciences). For strains harboring a zinc-inducible plasmid, CY was supplemented with 0.15 mM ZnCl<sub>2</sub> to induce protein expression. For transformation, about 250 ng of DNA was added to cells treated with synthetic competence stimulating peptide 1 in TH medium at pH 8.0 supplemented with 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Cells were grown for 2 h at 37°C/5%CO<sub>2</sub>, and transformants were selected on Columbia (BD Sciences) blood (4%) agar plates containing the appropriate antibiotics (streptomycin 400  $\mu$ g/ml, kanamycin 300  $\mu$ g/ml, chloramphenicol 4.5  $\mu$ g/ml). Continuous growth was followed by inoculating 2.5 ml of CY medium in 24-wells plates, which were sealed and incubated at 37°C in a FLUOstar plate reader (BMG Labtech) equipped with a 595-nm filter. The OD<sub>595</sub> was recorded every 10 to 20 min after shaking. Each point was done in triplicate. LytA sensitivity was determined by adding recombinant His-LytA at 10 $\mu$ g/mL either at OD<sub>595nm</sub> 0.3-0.4 or during the entire culture period. The latter condition was also used to evaluate the lysozyme sensitivity added at the final concentration of 100  $\mu$ g/ml. Penicillin sensitivity was determined by adding 4 or 8 ng/ml to CY medium. For labeling of newly synthesized peptidoglycan, cells

**Table 1**

Constructs	Genotype/description/sequence	Source
<b><i>S. pneumoniae</i> strains</b>		
R6		
R800	<i>R6 rpsL1</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	SUNG et al. 2001
<i>ftsZ-kan-rpsL</i>	<i>R800</i> ; <i>ftsZ::ftsZ-kan-rpsL</i> ; <i>Kan<sup>R</sup></i>	FEURIE et al. 2014
<i>ftsZ-mKate</i>	<i>R800 ftsZ::ftsZ-mKate</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	This work
R800 <i>P<sub>Zn</sub>-adr</i>	<i>R800 bgaA::P<sub>Zn</sub>-adr (pJBadr)</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i> , <i>Tet<sup>R</sup></i>	This work
R800 <i>P<sub>Zn</sub></i>	<i>R800 bgaA::P<sub>Zn</sub> (pADG02)</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i> , <i>Tet<sup>R</sup></i>	This work
<i>R6 lytA</i>	<i>R6 lytA::cat</i> ; <i>Cat<sup>R</sup></i>	PAGLIERO et al. 2008
<i>ΔlytA</i>	<i>R800 lytA::cat</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i> <i>Cat<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δadr-kan-rpsL</i>	<i>R800 adr::kan-rpsL</i> ; <i>Kan<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δadr</i>	<i>R800 adr::Δadr</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δadr P<sub>Zn</sub>-adr</i>	<i>R800 adr::Δadr bgaA::P<sub>Zn</sub>-adr (pJBadr)</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i> , <i>Tet<sup>R</sup></i>	
<i>Δadr P<sub>Zn</sub></i>	<i>R800 adr::Δadr bgaA::P<sub>Zn</sub> (pADG02)</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i> , <i>Tet<sup>R</sup></i>	
<i>ΔpgdA-kan-rpsL</i>	<i>R800 pgdA::kan-rpsL</i> , <i>Kan<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δadr ΔlytA</i>	<i>R800 adr::Δadr lytA::cat</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i> , <i>Cat<sup>R</sup></i>	This work
<i>ΔpgdA ΔlytA</i>	<i>R800 pgdA::kan-rpsL lytA::cat</i> ; <i>Kan<sup>R</sup></i> , <i>Cat<sup>R</sup></i>	This work
<i>adr-sfGFPop</i>	<i>R800 adr::adr-sfGFPop</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δadr ftsZ-kan-rpsL</i>	<i>R800 adr::Δadr ftsZ::ftsZ-kan-rpsL</i> ; <i>Kan<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δadr ftsZ-mKate</i>	<i>R800 adr::Δadr</i> ; <i>ftsZ::ftsZ-mKate</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δadr-kan-rpsL ftsZ-mKate</i>	<i>R800 adr::kan-rpsL</i> ; <i>ftsZ::ftsZ-mKate</i> ; <i>Kan<sup>R</sup></i>	This work
<i>adr-sfGFPop ftsZ-mKate</i>	<i>R800 adr::adr-sfGFPop ftsZ::ftsZ-mKate</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	This work
<i>ΔmapZ</i>	<i>R800 mapZ::ΔmapZ</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	FLEURIE et al. 2014
<i>ΔmapZ Δadr-kan-rpsL</i>	<i>R800 mapZ::ΔmapZ adr::kan-rpsL</i> ; <i>Kan<sup>R</sup></i>	This work
<i>ΔmapZ adr-sfGFPop ftsZ-mKate</i>	<i>R800 mapZ::ΔmapZ adr::adr-sfGFPop ftsZ::ftsZ-mKate</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	This work
<i>ΔgpsB</i>	<i>R800 gpsB::gpsB</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	FLEURIE et al. 2014a
<i>ΔgpsB Δadr-kan-rpsL</i>	<i>R800 gpsB::gpsB adr::kan-rpsL</i> ; <i>Kan<sup>R</sup></i>	This work
<i>ΔgpsB Δadr-sfGFPop ftsZ-mKate</i>	<i>R800 gpsB::gpsB adr::adr-sfGFPop ftsZ::ftsZ-mKate</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δpbp1a</i>	<i>R6</i> , <i>Cat<sup>R</sup></i>	PAIK et al. 1999
<i>Δpbp1a rpsL1</i>	<i>R6 rpsL1 pbp1a::cat</i> ; <i>Cat<sup>R</sup></i> , <i>Str<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δpbp1a Δadr-kan-rpsL</i>	<i>R6 rpsL1 pbp1a::cat adr::kan-rpsL</i> ; <i>Cat<sup>R</sup></i> , <i>Kan<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δpbp1a adr-sfGFPop</i>	<i>R6 rpsL1 pbp1a::cat adr::adr-sfGFPop</i> ; <i>Cat<sup>R</sup></i> , <i>Str<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δpbp1b</i>	<i>R6</i> , <i>Cat<sup>R</sup></i>	PAIK et al. 1999
<i>Δpbp1b rpsL1</i>	<i>R6 rpsL1 pbp1b::cat</i> ; <i>Cat<sup>R</sup></i> , <i>Str<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δpbp1b Δadr-kan-rpsL</i>	<i>R6 rpsL1 pbp1b::cat adr::kan-rpsL</i> ; <i>Cat<sup>R</sup></i> , <i>Kan<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δpbp1b adr-sfGFPop</i>	<i>R6 rpsL1 pbp1b::cat adr::adr-sfGFPop</i> ; <i>Cat<sup>R</sup></i> , <i>Str<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δpbp2a</i>	<i>R6</i> , <i>Cat<sup>R</sup></i>	PAIK et al. 1999
<i>Δpbp2a rpsL1</i>	<i>R6 rpsL1 pbp2a::cat</i> ; <i>Cat<sup>R</sup></i> , <i>Str<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δpbp2a Δadr-kan-rpsL</i>	<i>R6 rpsL1 pbp2a::cat adr::kan-rpsL</i> ; <i>Cat<sup>R</sup></i> , <i>Kan<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δpbp2a adr-sfGFPop</i>	<i>R6 rpsL1 pbp2a::cat adr::adr-sfGFPop</i> ; <i>Cat<sup>R</sup></i> , <i>Str<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δpbp3</i>	<i>R6</i> , <i>dacAC-ter::ery</i> ; <i>Ery<sup>R</sup></i>	SCHUSTER et al. 1990
<i>Δpbp3 rpsL1</i>	<i>R6 rpsL1, dacAC-ter::ery</i> ; <i>Ery<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δpbp3 Δadr-kan-rpsL</i>	<i>R6 rpsL1 dacAC-ter::ery adr::kan-rpsL</i> ; <i>Ery<sup>R</sup></i> , <i>Kan<sup>R</sup></i>	This work
<i>Δpbp3 adr-sfGFPop</i>	<i>R6 rpsL1 dacAC-ter::ery adr::adr-sfGFPop</i> ; <i>Ery<sup>R</sup></i> , <i>Str<sup>R</sup></i>	This work
<i>ΔspxB</i>	<i>R6 spxB::kan</i> ; <i>Kan<sup>R</sup></i>	This work
<i>ΔspxB ΔlytA</i>	<i>R6 spxB::kan adr::cat</i> ; <i>Kan<sup>R</sup></i> , <i>Cat<sup>R</sup></i>	This work
<b>Plasmids</b>		
pJWV25	[ <i>bgaA::P<sub>Zn</sub>-gfp+</i> ], <i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>Tet<sup>R</sup></i>	EBERHARDT et al. 2009
pCM38	[ <i>bgaA::P<sub>Zn</sub>-gfp+</i> ], <i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>Tet<sup>R</sup></i> , <i>AgeI</i>	This work
pCM83	[ <i>bgaA::P<sub>Zn</sub>-sfGFPopt</i> ], <i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>Tet<sup>R</sup></i> , <i>AgeI</i>	This work
pADG0	[ <i>bgaA::P<sub>Zn</sub>-sfGFPopt</i> ], <i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>Tet<sup>R</sup></i> , <i>AgeI</i> , <i>BssHII</i> , <i>BsiWI</i>	This work
pADG02	[ <i>bgaA::P<sub>Zn</sub></i> ], <i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>Tet<sup>R</sup></i> , <i>AgeI</i> , <i>BssHII</i> , <i>BsiWI</i>	This work
pJBadr	[ <i>bgaA::P<sub>Zn</sub>-adr</i> ], <i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>Tet<sup>R</sup></i> , <i>AgeI</i> , <i>BssHII</i> , <i>BsiWI</i>	This work
pET28-His-LytA	pET28a: <i>his-lytA</i> <i>Kan<sup>R</sup></i> , <i>Cm<sup>R</sup></i>	PHILIPPE et al. 2015
pET28-His-LytAE87Q	pET28a: <i>his-lytAE87A</i> <i>Kan<sup>R</sup></i> , <i>Cm<sup>R</sup></i>	This work
<b>Oligonucleotides</b>		
FORoJB1	ggctatgggcttgatgagtc	This work
	To amplify <i>lytA::cat</i> cassette	
FORoJB2	gcataaggtatccatcc	This work
	To amplify <i>lytA::cat</i> cassette	

FORoJB3	actgtcttccagcttcg amplification upstream of the <i>adr</i> gene	This work
REVoJB6	acctccaagtacctgctg amplification downstream of the <i>adr</i> gene	This work
REVoJB7	ttagatccggatccctcgagtttgattaacggctgtcttgag Construction of <i>adr-sfGFPop</i>	This work
FORoJB8	atggatgaattgtacaataactc aag aca agccggtaaact Construction of <i>adr-sfGFPop</i>	This work
FORoJB9	ctcgaggatccggatctaaaggtgaagagtggtt <i>sfGFPop</i> amplification	This work
REVoJB10	ttgtacaattcatccatacc <i>sfGFPop</i> amplification	This work
REVoJB35	taaccggtgtcttacgagtttattctcttcattgtac Construction of <i>adr::Aadr</i>	This work
FORoJB36	gaagaataaactcgaagacaagccggttaatacaataaac Construction of <i>adr::Aadr</i>	This work
FORoJB57	cgcgcgcatgcgcatataatggtttcttgattaggattatag Construction of pJBadr	This work
REVoJB58	gcgctagcttatttgattaacggctgtcttgagctgt Construction of pJBadr	This work
FORoMJ129	gatagcggcagttccgtaga Construction of <i>pgdA::kan-rpsI</i>	This work
FORoMJ62	ggttgaatgcttcaatcagtgaaaccgctcataggtctcagc insertion of E87Q mutation in the pET28-His-LytA plasmid	This work
REVoMJ63	gctgagacctatgcagcggttcaactgattgaaagccattcaacc insertion of E87Q mutation in the pET28-His-LytA plasmid	This work
FORoMJ130	ttgattgaccgaggaacga Construction of <i>pgdA::kan-rpsI</i>	This work
FORoMJ142	cattaaaaatcaaacggatctgccagctctagctctac Construction of <i>pgdA::kan-rpsI</i>	This work
FORoMJ143	agggcccggtctcagctgtactatagctgtagt Construction of <i>pgdA::kan-rpsI</i>	This work
FORoMJ42	cctatecgctcttgcaagc amplification upstream of the <i>ftsZ</i> gene for <i>ftsZ-kan-rpsI</i> and <i>ftsZ-mKate</i> amplification	JACQ et al. 2015
FORoMJ47	cttttaagacatggttctctctac amplification downstream of the <i>ftsZ</i> gene for <i>ftsZ-kan-rpsI</i> and <i>ftsZ-mKate</i> amplification	JACQ et al. 2015
P1	ccggttgattttaatggataatg <i>Kan-rpsI</i> amplification	This work
P2	agagacctgggcccttcc <i>Kan-rpsI</i> amplification	This work
F1rpsL1	ggtggtgtattctgttgggt Forward rpsL1 amplification	This work
R1rpsL1	aactgggactggttagtaaccac Reverse rpsL1 amplification	This work

---

Amp, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Kan, kanamycin; Tet, tetracycline; Str, streptomycin.



were grown in CY at OD<sub>595nm</sub> 0.4 at 37°C/5%CO<sub>2</sub>, pelleted at room temperature for 2 min at 4500 g, resuspended and incubated for 3 min in CY supplemented with 2 mM HADA (KURU et al., 2012). After two washes in CY to discard unbound dye, cells were resuspended into CY and immediately observed.

**Fluorescence microscopy image acquisition and analysis.** Cells were grown at 37°C/5%CO<sub>2</sub> in CY to OD<sub>595nm</sub> 0.3, transferred to microscope slides, and observed at 37°C on an Olympus BX61 microscope equipped with a UPFLN 100 O-2PH/1.3 objective and a QImaging Retiga-SRV 1394 cooled charge-coupled-device camera. Image acquisition was performed using the software packages Volocity. Images were analyzed using the open-source softwares MicrobeTracker (SLIUSARENKO et al., 2011) and Oufi (PAINTDAKHI et al., 2016) and processed with Adobe Photoshop CS5 and Image J. Demographs integrate the signal values in each cell. The cells were sorted by their length value and the fluorescence values were plotted as a heat map. Time-lapse microscopy using agarose pad was performed as follows. A glycerol stock of adr-sfGFPop FtsZ-mKate2 strain was inoculated in 5 ml of CY medium and grown to OD<sub>595nm</sub> of 0.1. An agarose pad containing CY medium and 1.2% low-melting agarose was prepared on a microscopy slide, as described by JONG et al., 2011. A volume of 2.5  $\mu$ l of culture was loaded on the agarose pad, a coverslip was mounted and the samples were observed. Images were acquired every 3 min or 6 min during 1 hour using an automated inverted epifluorescence microscope Nikon Ti-E/B equipped with the "perfect focus system" (PFS, Nikon), a phase contrast objective (CFI Plan Apo Lambda DM 100X, NA1.45), a Semrock filter set for GFP (Ex : 482BP35 ; DM : 506 ; Em : 536BP40) and mCherry (Ex : 562BP40 ; DM : 593 ; Em : 640BP75), a LED light source (Spectra X Light Engine, Lumencor), a cCMOS camera (Neo sCMOS, Andor) and a chamber thermostated at 37°C. Fluorescence images were captured and processed using Nis-Elements AR software (Nikon). GFP fluorescence images were false colored green and overlaid on phase contrast images.

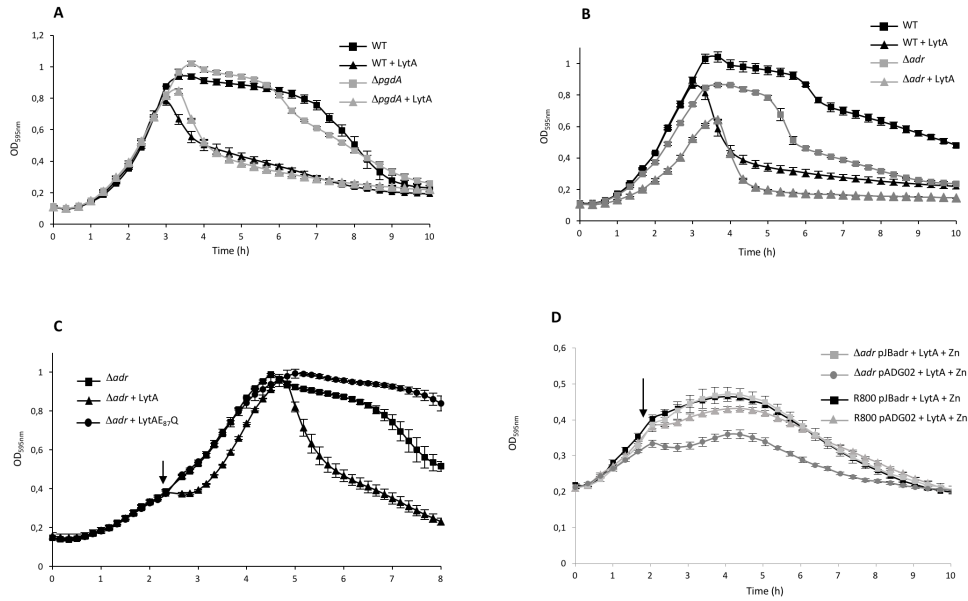
**Electron microscopy.** For high pressure freezing and sectioning, cells were grown in 40 ml of CY at 37°C CO<sub>2</sub> to OD<sub>595nm</sub> 0.3-0.4, recombinant His-LytA was added at a final concentration of 10  $\mu$ g/ml, and incubation was pursued for 7 min. Cells were centrifuged at 4500 g for 5 min. A pellet volume of 1.4  $\mu$ l was dispensed on the 200- $\mu$ m side of a type A 3-mm gold platelet (Leica Microsystems), covered with the flat side of a type B 3-mm aluminum platelet (Leica Microsystems), and was vitrified by high-pressure freezing using an HPM100 system (Leica Microsystems). Next, the samples were freeze substituted at -90°C for 80 h in acetone supplemented with 1% OsO<sub>4</sub> and warmed up slowly (1°C/h) to -60°C in an automated freeze

substitution device (AFS2; Leica Microsystems). After 8 to 12 h, the temperature was raised (1°C/h) to -30°C, and the samples were kept at this temperature for another 8 to 12 h before a step for 1h at 0°C, cooled down to 30°C and then rinsed 4 times in pure acetone. The samples were then infiltrated with gradually increasing concentrations of Agar Low Viscosity Resin (LVR; Agar Scientific) in acetone (1 :2, 1 :1, 2 :1 [vol/vol], and pure) for 2 to 3 h while raising the temperature to 20°C. Pure LVR was added at room temperature. After polymerization 24h at 60°C, 70 to 200-nm sections were obtained using an ultra-microtome UC7 (Leica Microsystems) and an Ultra 35° diamond knife (DiATOME) and were collected on formvar-carbon-coated 100-mesh copper or nickel grids. The thin sections were post-stained for 10 min with 2% aqueous uranyl acetate, rinsed, and incubated for 5 min with lead citrate. Digital images were obtained using a Tecnai G2 Spirit BioTwin microscope (FEI) operating at 120 kV with an Orius SC1000 CCD camera (Gatan). For negative staining, cells were grown in CY medium until OD<sub>595nm</sub> 0.3 and incubated or not with LytA at 5 µg/ml during 20 min at 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Cell lysis was stopped by the addition of glutaraldehyde at a final concentration of 2%. Cells were centrifuged 10 min at 4500g, resuspended in 100µL of PBS 2% glutaraldehyde and incubated for 1h at RT. The fixed cells were washed three times and resuspended in 50µL of water. Whole cells observation was made using the mica-carbon flotation technique on phosphotungstate (PTA) 2%. Digital images were obtained using a Tecnai G2 Spirit BioTwin microscope (FEI) operating at 120 kV with an Orius SC1000 CCD Camera (Gatan).

## 5.2.4 Results

**Peptidoglycan O-acetylation protects pneumococcal cells from LytA-induced lysis during exponential growth.** PgdA and Adr proteins are responsible for peptidoglycan N-deacetylation and O-acetylation in *S. pneumoniae*, respectively. Since both modifications have been shown to protect peptidoglycan from lysozyme cleavage, we wondered whether they affect the action of the major pneumococcal autolysin LytA (TOMASZ, 1968; HOWARD et GOODER, 1974). LytA is an amidase responsible for autolysis during stationary phase, penicillin induced lysis and also involved in fratricide. The pneumococcus is sensitive to this amidase only when the cells enter into stationary phase, during nutrient depletion or the use of antibiotic blocking the peptidoglycan biosynthesis machinery (TOMASZ et WAKS, 1975; MELLROTH et al., 2012), suggesting that the sensitivity of the peptidoglycan towards LytA is primarily driven by the peptidoglycan machinery activity.

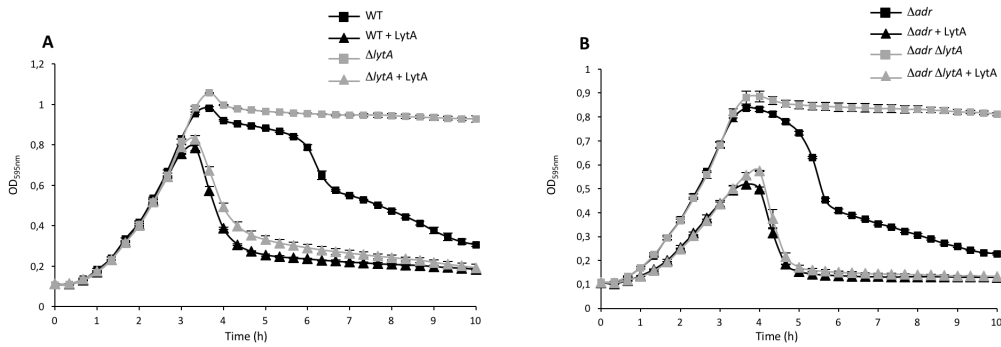
The  $\Delta pgdA$  and  $\Delta adr$  mutant strains were tested for their sensitivity towards LytA.



**FIGURE 5.1 – Effect of LytA on pneumococci in exponential growth phase in CY medium.** **A.** Growth curves of WT and  $\Delta pgdA$  strains in the absence or in the presence of LytA at 10  $\mu\text{g/ml}$ . **B.** Growth curves of WT and  $\Delta adr$  strains in the absence or in the presence of LytA at 10  $\mu\text{g/ml}$ . **C.** Growth curves of  $\Delta adr$  strain in the presence of active LytA or inactive LytAE87Q forms, both proteins (final concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$ ) were added at mid-exponential phase, OD<sub>595nm</sub> 0.3-0.4 as indicated by the arrow. **D.** Complementation of the *adr* gene deletion. The pneumococcal  $\Delta adr$  or the WT strains were transformed with the Zn-inducible plasmid pJBadr containing a copy of *adr* or with the empty plasmid (pADG02). Active LytA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) was added at mid-exponential phase (OD<sub>595nm</sub> 0.3-0.4, arrow).

Wild-type (WT) and mutant strains were grown in the absence or in the presence of purified LytA, added in the culture at the final concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 5.1, p.106).

The WT and  $\Delta pgdA$  strains were equally resistant to LytA during exponential growth but became sensitive to the amidase at the onset of stationary phase since rapid decrease of OD<sub>595nm</sub> was observed in cultures containing LytA compared to the cultures performed in the absence of LytA (Fig. 5.1A, p.106). This observation indicates that the N-acetylation pattern of the peptidoglycan is not involved in the protection from LytA cleavage during exponential growth. By contrast, the  $\Delta adr$  strain is sensitive to LytA in exponential phase since growth was slowed down in the presence of LytA when compared to the WT strain (Fig. 5.1B, p.106). We noticed that in the absence of exogenous LytA, the culture does not reach the same maximal density as the WT strain and the autolysis process takes place earlier for the mutant than for the WT strain, indicating that the  $\Delta adr$  strain is more sensitive to the action of released endogenous LytA (Fig. 5.1B, p.106). Deletion of the endogenous *lytA* in the WT and  $\Delta adr$  genetic backgrounds did not affect sensitivity towards

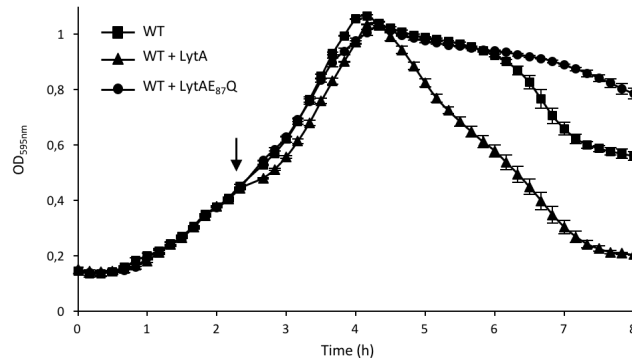


**FIGURE 5.2 – Susceptibility of various pneumococcal strains to LytA.** **A.** Growth curves of WT and  $\Delta$ lytA strains in the absence or in the presence of LytA at 10  $\mu$ g/ml. **B.** Growth curves of  $\Delta$ adr and  $\Delta$ adr $\Delta$ lytA strains in the absence or in the presence of LytA at 10  $\mu$ g/ml.

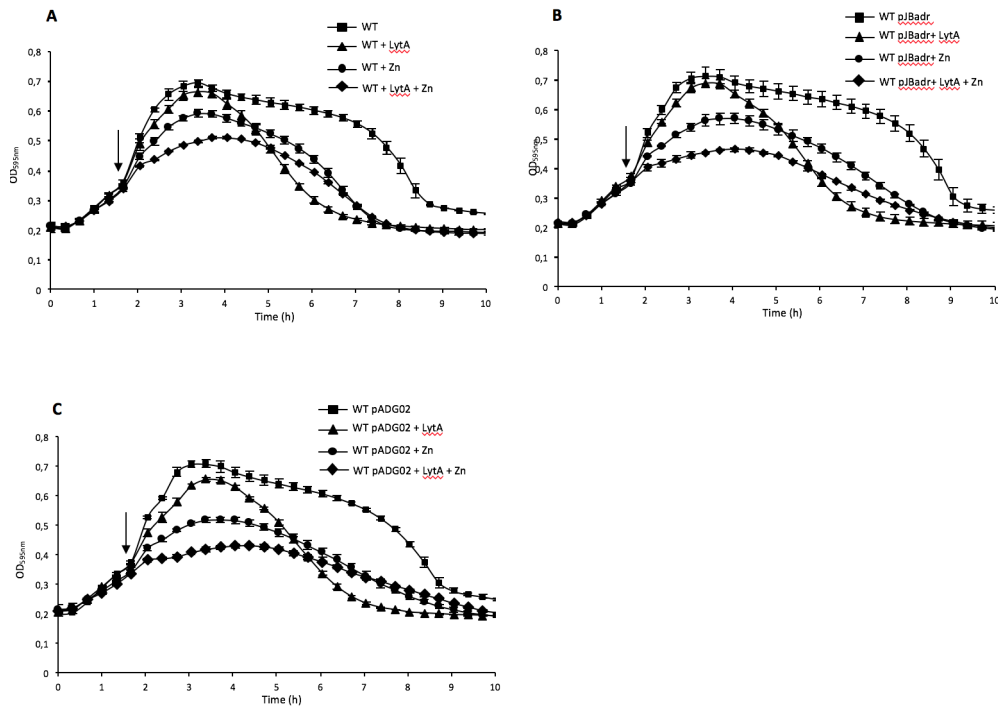
exogenous LytA suggesting that Adr alone is responsible for the observed phenotype (Fig. 5.2, p.107, supplemental).

Complementary experiments were performed by adding purified LytA at the final concentration of 10  $\mu$ g/ml into the culture at mid-exponential growth phase (Figs. 5.1C and 5.1D, p.106). While the WT growth was slightly reduced, a growth arrest was observed as soon as LytA was added to the  $\Delta$ adr culture (Fig. 5.1C, p.106). Importantly, no effect was detected upon addition of the inactive LytAE87Q variant, indicating that the enzymatic activity of LytA (and not the protein presence) accounts for the impairment of the growth rate during  $\Delta$ adr exponential phase (Fig. 5.1C, p.106). As expected, no effect of the LytAE87Q form was observed on the WT strain (Fig. 5.3, p.108, supplemental). To verify that the effect of *adr* deletion was not polar, the  $\Delta$ adr strain was complemented with an ectopic copy of the *adr* gene placed under the control of a Zn-inducible promoter (Fig. 5.4, p.108, supplemental). The  $\Delta$ adr strain carrying the plasmid encoding *adr* (pJBadr) or the empty plasmid (pADG02) were grown in the presence of Zn and LytA (Fig. 5.1D, p.106). As expected, in the absence of *adr*, growth was arrested as soon as LytA was added in the culture at mid-exponential phase (OD<sub>595nm</sub> 0.3) while expression of the ectopic copy of *adr* allowed cells to multiply and reach OD<sub>595nm</sub> 0.5 (Fig. 5.1D, p.106). This result shows that presence of Adr restored protection against LytA although the WT phenotype was not fully recovered (Figs. 5.1D, p.106 and 5.4 page 108), most probably because the expression level from the Zn-inducible promoter is lower than the endogenous expression level (EBERHARDT et al., 2009; MORLOT et al., 2013).

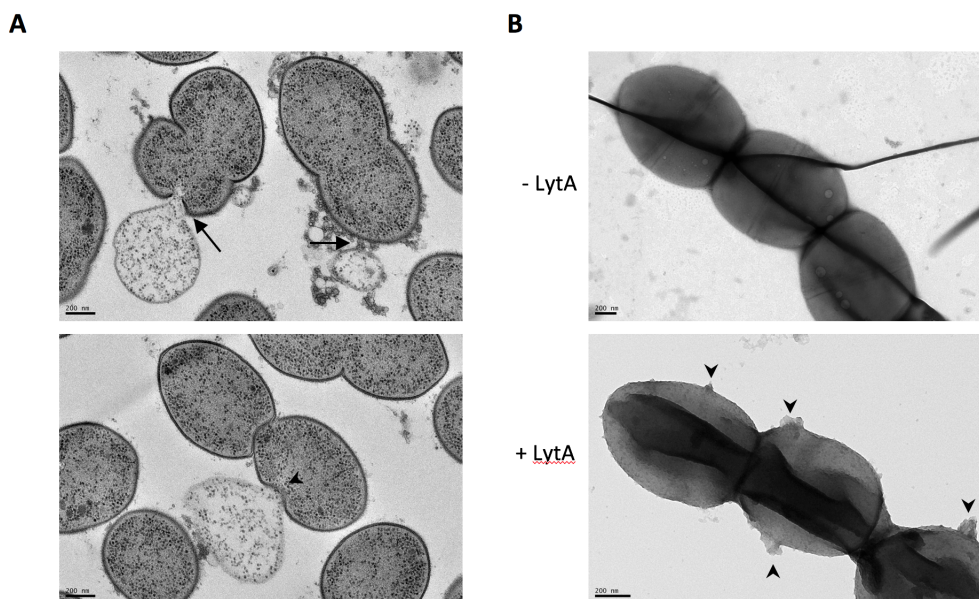
We next wondered whether the sensitivity of the  $\Delta$ adr strain to LytA during exponential growth was associated with cell lysis. To investigate this phenomenon,



**FIGURE 5.3** – Susceptibility of the WT pneumococcal strain to LytA. Growth curves of WT strain in the presence of active LytA or inactive LytAE87Q forms, both proteins (final concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were added at mid-exponential phase, OD595nm 0.3-0.4 (arrow).



**FIGURE 5.4** – Effect of Zn on pneumococcal growth. **A.** Growth curves of the WT strain in the presence of LytA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) added at mid-exponential phase (arrow) and/or 0.15 mM of Zn. **B.** Growth curves of the WT strain transformed with the plasmid pJBadr expressing *adr* in the presence of LytA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) added at mid-exponential phase (arrow) and/or 0.15 mM of Zn. **C.** Growth curves of WT strain transformed with the empty plasmid pADG02 in the presence of LytA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) added at mid-exponential phase (arrow) and/or 0.15 mM of Zn.



**FIGURE 5.5 – LytA induces cell lysis of growing cells harbouring unacetylated peptidoglycan.** **A.** Transmission electron micrographs of thin sections of  $\Delta adr$  cells harvested at mid-exponential growth phase and incubated with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of LytA for 20 min at 37°C/CO<sub>2</sub> in CY medium. Cell lysis occurring at the poles (arrows) and at the septal site (arrow heads) are shown, as well as ejection of cytoplasmic material. Scale bars, 200 nm. **B.** Cells treated as in A were observed by transmission electron microscopy. In the absence of LytA, the cell surface is smooth (upper panel, scale bar 200 nm) while the action of LytA (incubation time of 20 min) induced extrusions at the cell surface (lower panel, arrow heads). Scale bar, 200 nm).

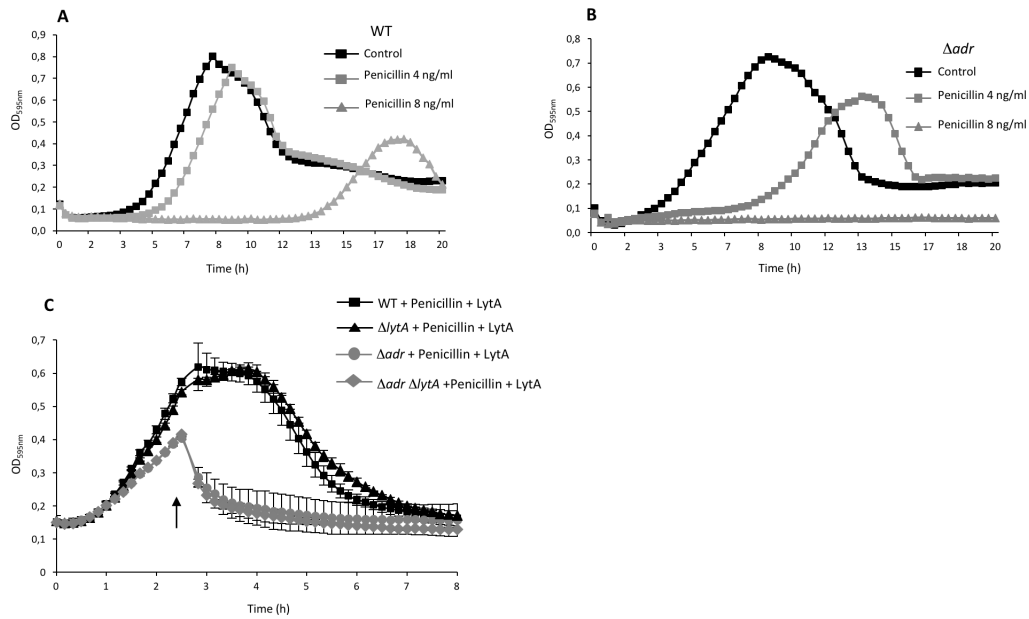
growing  $\Delta adr$  cells incubated with LytA were observed by transmission electron microscopy (TEM). To preserve cellular ultrastructure, cells were vitrified by high-pressure freezing, gradually embedded with agar resin in acetone and 70-nm sectioned (see Materials for complete description of the procedure).

Electron micrographs of ultrathin sections of  $\Delta adr$  cells showed disruptions of the cell envelope at the poles (Fig. 5.5A, p.109, arrows) and at the septal site (Fig. 5.5A, p.109, arrow heads), causing the release of cytoplasmic content. Statistical analysis of images such as those shown in Fig 5.5A (p.109) revealed that 16% of  $\Delta adr$  cells (n=280) were lysing while this phenomenon occurred only in 5% of the WT cells (n=340). These values are not absolute because the counting procedure discards a majority of cells not sectioned in the longitudinal axis. However, these data are representative of the global behavior of the cell population and they are further supported by the observation of similar LytA-induced lysis events in whole  $\Delta adr$  cells observed by TEM (Fig. 5.5B, p.109, arrow heads). We then propose that the growth delay induced by LytA observed in  $\Delta adr$  cultures is due to the killing of targeted cells while non-lyzed sibling cells continue to divide until stationary phase

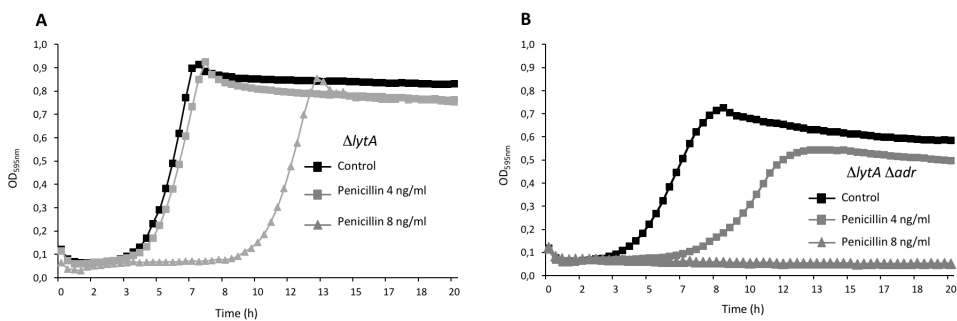
is reached. Altogether, these data show that in the absence of Adr, LytA is able to lyse pneumococcal cells during exponential growth indicating that O-acetylation protects the peptidoglycan from LytA cleavage.

**The absence of Adr expression increases the sensitivity to  $\beta$ -lactams.** We showed that growing pneumococcal cells are more sensitive to LytA in the absence of Adr. Moreover, LytA sensitivity was also observed when peptidoglycan synthesis was inhibited by  $\beta$ -lactam antibiotics (MELLROTH et al., 2012). We thus wondered whether inhibition of peptidoglycan biosynthesis and absence of O-acetylation would have a cumulative effect on LytA sensitivity. The sensitivity of  $\Delta adr$  and WT strains to penicillin was investigated by comparing the growth profiles of these strains in the presence of 4 and 8 ng/ml of penicillin, which are concentrations lower than the minimal inhibitory concentration value (16 ng/ml). Growth of the WT strain was only slightly delayed (by about 1 h) in the presence 4 ng/ml of penicillin and largely delayed (by about 10 h) by 8 ng/ml of penicillin (Fig. 5.6A, p.111). Growth of the  $\Delta adr$  strain was much more delayed (by about 5 h) at the lower concentration of penicillin and no growth was observed in the presence of 8 ng/ml of penicillin (Fig. 5.6B, p.111). Since LytA is known to trigger lysis in the presence of penicillin, similar experiments were performed in the  $\Delta lytA$  genetic background to assess the specific role of Adr in penicillin sensitivity (Fig. 5.7, p.111, supplemental). Comparable patterns were obtained when compared to the WT strain, indicating that peptidoglycan O-acetylation is important to resist to penicillin-induced lysis as observed previously (CRISOSTOMO et al., 2006) and that it acts independently from endogenous LytA. Since the  $\Delta adr$  strain appeared to be more sensitive to lysis induced by LytA and penicillin, we wondered whether these effects would be cumulative. Cultures of the WT,  $\Delta adr$ ,  $\Delta lytA$  and  $\Delta adr\Delta lytA$  strains were performed in the presence of 8 ng/ml of penicillin and LytA was added at mid-exponential phase. Single  $\Delta adr$  and double  $\Delta adr\Delta lytA$  strains were more sensitive to lysis in the presence of both penicillin and LytA than the WT and  $\Delta lytA$  strains (Figs. 5.6C p.111 and supplemental 5.8 p.112). In conclusion, the absence of MurNAc O-acetylation and the decrease of peptides cross-link (as the consequence of the transpeptidation inhibition by penicillin) generate a weak peptidoglycan matrix highly sensitive to lysis. These data suggest that the cross-link of peptides catalyzed by the PBPs and the O-acetylation of MurNAc performed by Adr might be functionally dependent activities.

**Morphology and cell wall defects of the  $\Delta adr$  strain.** To further study the relationship between O-acetylation and peptidoglycan synthesis, we analyzed the morphology of the  $\Delta adr$  strain by light microscopy. A significant proportion

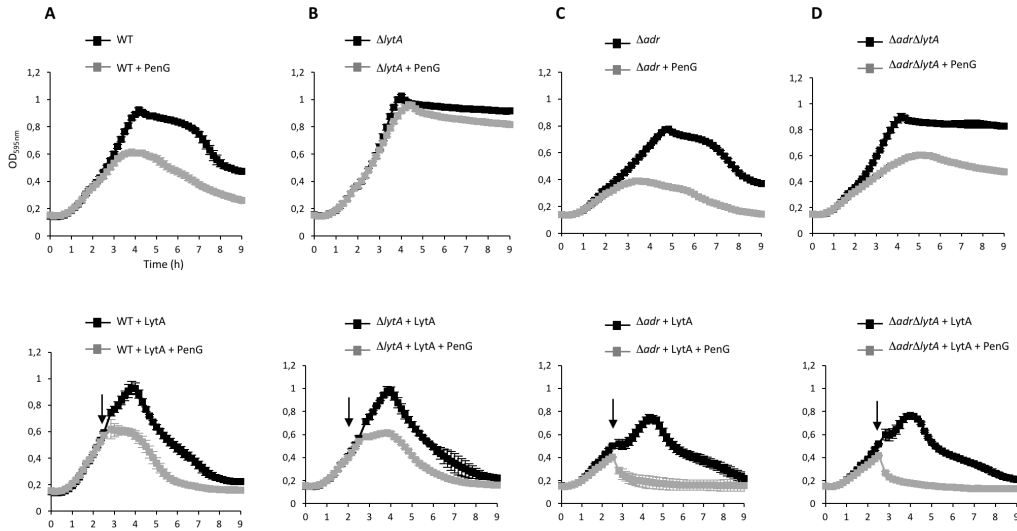


**FIGURE 5.6 – Unacetylated peptidoglycan is more sensitive to penicillin-induced lysis.** **A.** Growth curves of WT strain in the absence or the presence of penicillin at 4 and 8 ng/ml. **B.** Growth curves of  $\Delta adr$  strain in the absence or the presence of penicillin at 4 and 8 ng/ml. **C.** Sensitivity to cell lysis mediated by penicillin (4 ng/ml) and LytA (10  $\mu$ g/ml), the latter was added at mid-exponential phase (arrow).



**FIGURE 5.7 – Susceptibility of various pneumococcal strains to penicillin.** **A.** Growth curves of the  $\Delta lytA$  strain in the absence or in the presence of penicillin at 4 and 8 ng/ml. **B.** Growth curves of the  $\Delta adr \Delta lytA$  strain in the absence or in the presence of penicillin at 4 and 8 ng/ml.

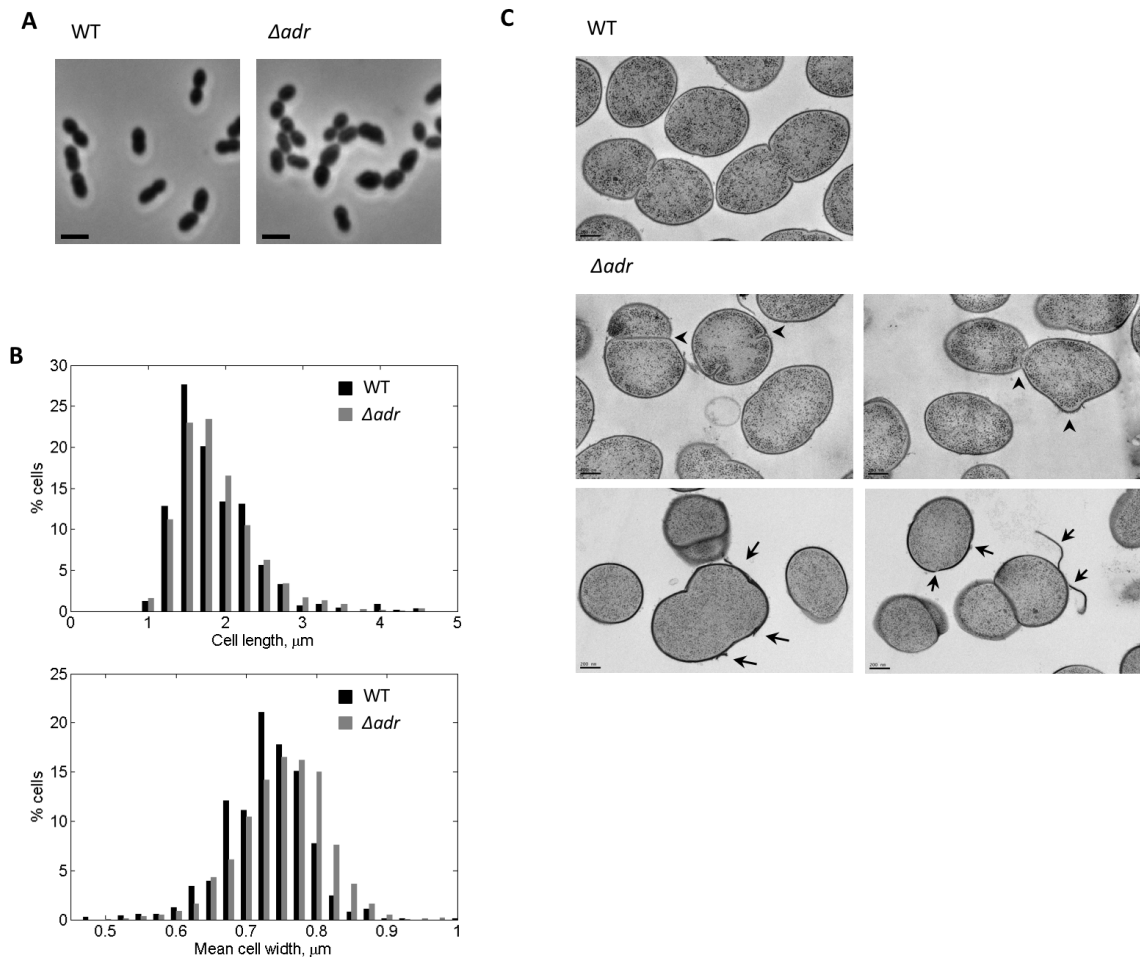




**FIGURE 5.8 – Susceptibility of various pneumococcal strains to penicillin and LytA.** **A.** Growth curves of the WT strain in the presence of penicillin at 8 ng/ml and LytA (10  $\mu$ g/ml) added at mid-exponential phase (arrow). **B.** Growth curves of the  $\Delta$ *lytA* strain in the presence of penicillin at 8 ng/ml and LytA (10  $\mu$ g/ml) added at mid-exponential phase (arrow). **C.** Growth curves of the  $\Delta$ *adr* strain in the presence of penicillin at 8 ng/ml and LytA (10  $\mu$ g/ml) added at mid-exponential phase (arrow). **D.** Growth curves of the  $\Delta$ *adr* $\Delta$ *lytA* strain in the presence of penicillin at 8 ng/ml and LytA (10  $\mu$ g/ml) added at mid-exponential phase (arrow).

of  $\Delta$ *adr* cells (about 36%) were wider than the WT cells (Figs. 5.9A and 5.9B, p.113). Additional analysis of morphological defects displayed by  $\Delta$ *adr* cells was performed by TEM in conditions that preserve cellular ultrastructures as described above. The mutants cells revealed altered shape with misplaced or non-planar septa (Fig. 5.9C arrow heads, p.113). The cell wall of  $\Delta$ *adr* cells also presented important structural defects since fragments detaching from the cell surface were observed (Fig. 5.9C arrows, p.113). Altogether, these results confirm that in the absence of O-acetylation, the peptidoglycan network is weakened, which in turn impacts the cell morphology.

**Adr co-localizes with the division machinery at the onset of the cell cycle.** Defects of the  $\Delta$ *adr* strain in peptidoglycan integrity and in cellular morphology suggest that Adr function might be coupled to the activity of the division machinery. To investigate this, we first assessed the cellular localization of Adr using fluorescence microscopy. The C-terminal end of Adr (Fig. 5.11A, p.116, supplemental) was fused to the superfolder green fluorescent protein (sfGFP) variant, which was engineered to display more robust refolding properties (PÉDELACQ et al., 2006) and was successfully used to detect fusion proteins exported in the periplasm of *E. coli* (DINH et BERNHARDT, 2011; DAMMEYER et TINNEFELD, 2012). The sfGFP



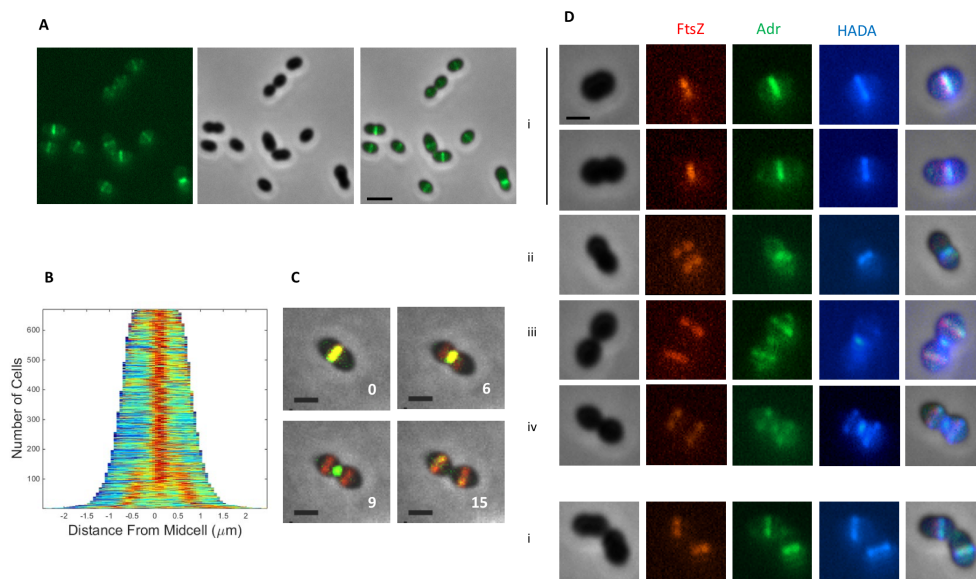
**FIGURE 5.9 – Morphological analysis of pneumococcal  $\Delta adr$  cells.** **A.** Phase contrast microscopy images of WT and  $\Delta adr$  exponentially growing cells in CY medium. Scale bars, 2  $\mu m$ . **B.** Distribution of the length (upper panel) and width parameters (lower panel) of  $\Delta adr$  cells compared to WT cells. Measurements were performed on at least 700 cells based on phase-contrast images using MicrobeTracker. **C.** Transmission electron micrographs of thin sections of  $\Delta adr$  cells harvested at mid-exponential growth phase. Scale bars, 200 nm. Arrow heads indicate defective septal initiation sites and arrows point to cell wall peeling and destructureations.

gene was optimized for expression in *S. pneumoniae* (sfGFPop) and fused to the 3' end of the *adr* gene at the chromosome locus. The pneumococcal strain expressing the Adr-sfGFPop variant displayed the same resistance pattern to LytA than the WT strain indicating that the fusion protein is functional (Fig. 5.11B, p.116, supplemental). Wide-field microscopy images showed that like most of the division and cell wall synthesis proteins, Adr is positioned at the parental division site and at the future division sites of daughter cells (Figs. 5.10A and 5.10B, p.115) (Supplementary Video 1).

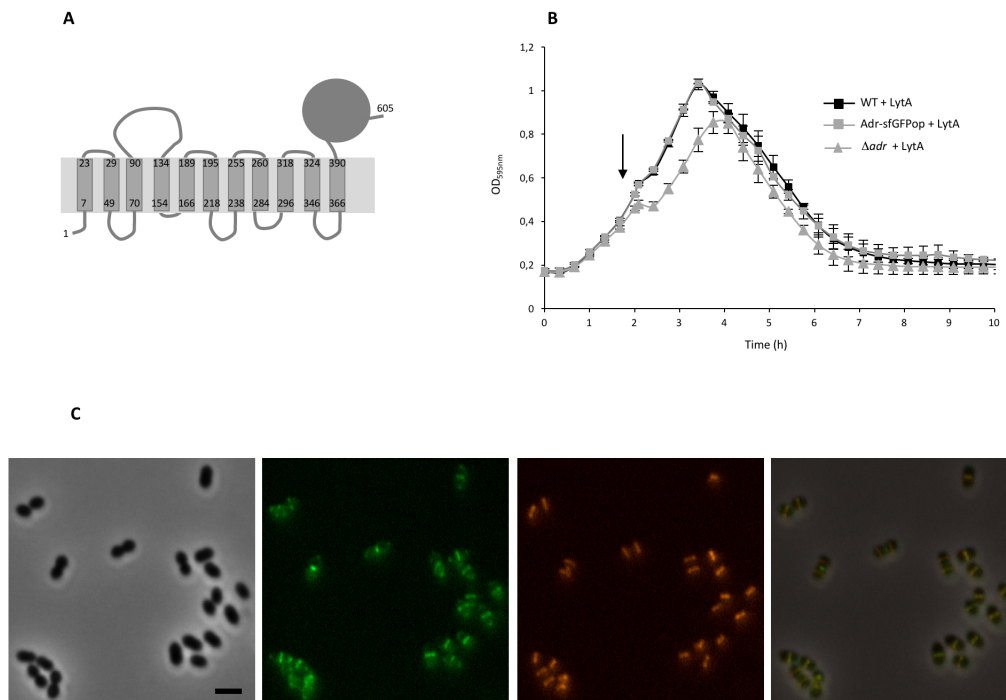
To determine whether Adr is an early or late division protein, we introduced the *adr*-sfGFPop construct in a pneumococcal strain expressing a FtsZ-mKate2 fusion (Fig. 5.11C, p.116, supplemental). Time-lapse experiments (Supplementary Video 2) revealed that Adr co-localizes with FtsZ at mid-cell only during the first division stages in the mother cell and in the daughter cells when they are about to initiate a new round of division (Fig 5.10C, panels 0 and 15 min, p.115). When FtsZ rings re-assembles at the future division sites of the newly formed daughter cells, Adr remains mainly associated to the parental septal site (Fig 5.10C, panels 6 and 9 min, p.115) (Supplementary Video 2). In conclusion, Adr localizes at the cell division site all along the cell cycle but its positioning lags behind the one of FtsZ. This postponed pattern of Adr relative to FtsZ localization is reminiscent of that of the PBPs (MORLOT et al., 2003; MORLOT et al., 2013; TSUI et al., 2014).

To determine the timing of Adr localization relative to peptidoglycan synthesis, the regions of active peptidoglycan synthesis were labeled by short incubation times with fluorescently labelled D-amino acids (HADA) (KURU et al., 2012) (Fig. 5.10D, p.115). At early division stages (i), FtsZ and Adr co-localize at mid-cell where new peptidoglycan is synthesized. When FtsZ rings re-localizes to the future division sites, Adr remains associated to the parental site where HADA labelling can still be detected (ii). At mid-division stage (iii), Adr migrates to the future division sites before peptidoglycan synthesis takes place, which occurs later on as shown by HADA labelling at the equator of the future daughter cells (iv). These data indicate that although Adr localizes to the septal site right after FtsZ, its positioning precedes peptidoglycan synthesis reported by fluorescent D-amino acids incorporation.

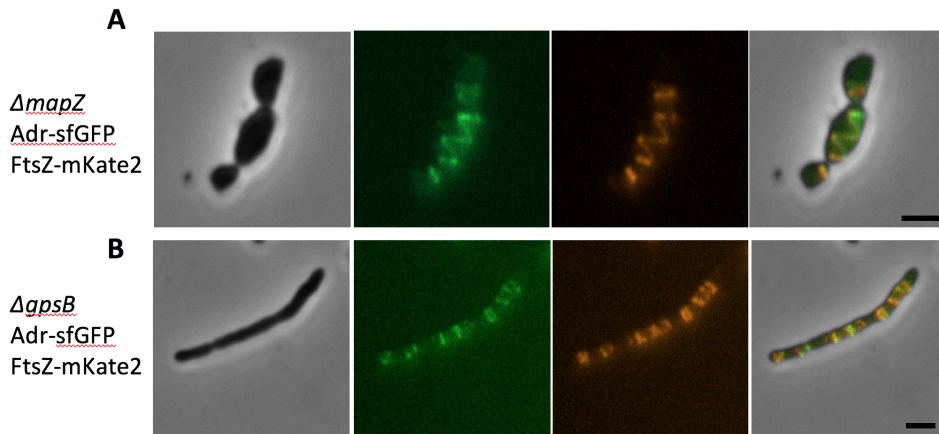
Maintenance of the bacterial cell shape is a complex process that involves multi-protein machineries composed by peptidoglycan biosynthetic enzymes and regulatory proteins (MASSIDDA, NOVÁKOVÁ et VOLLMER, 2013; EGAN et al., 2016). Among those, we focused on two proteins : MapZ that forms ring structures at the



**FIGURE 5.10 – Localization of ADR in WT cells.** **A.** ADR-sfGFPop localization in WT cells. GFP fluorescent signal (left), phase contrast (middle) and merge (right) images are shown. Scale bars, 2  $\mu\text{m}$ . **B.** Demograph of a pneumococcal cell population expressing ADR-sfGFPop. **C.** Fluorescence time-lapse microscopy of WT cells producing FtsZ-mKate2 and ADR-sfGFPop. Overlays between phase contrast (gray), GFP (green) and mKate (red) are shown. Stills are from Movie S2. Scale bar, 2  $\mu\text{m}$ . **D.** Pulse labeling with HADA of WT cells producing FtsZ-mKate2 and ADR-sfGFPop. Marks i to iv indicate stages of cell division. Scale bars, 2  $\mu\text{m}$ .



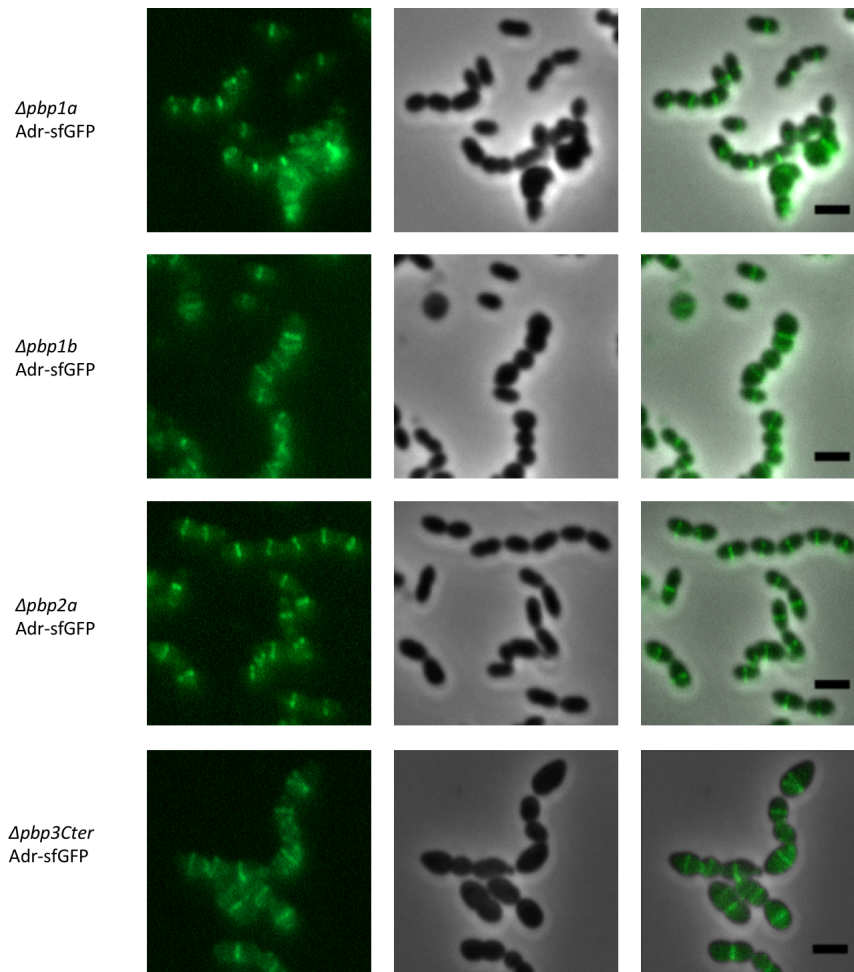
**FIGURE 5.11** – The Adr-sfGFPop fusion is functional in *S. pneumoniae*. **A**. Schematic representation of the Adr-sfGFPop topology predicted with Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/#>). The numbers correspond to the N- and C-termini residues and the extremities of the 11 transmembrane helices. The extracellular C-terminal acetyltransferase domain is represented as a grey circle. **B**. Growth curves of the strain expressing Adr-sfGFPop at the native locus as well as the WT and  $\Delta adr$  strains in the presence of LytA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) added at mid-exponential phase (arrow). **C**. Adr-sfGFPop and FtsZ-mKate2 localization in WT cells. Phase contrast (left), green fluorescent signal (middle left), red fluorescent signal (middle right) and merge (right) images are shown. Scale bar, 2  $\mu\text{m}$ .



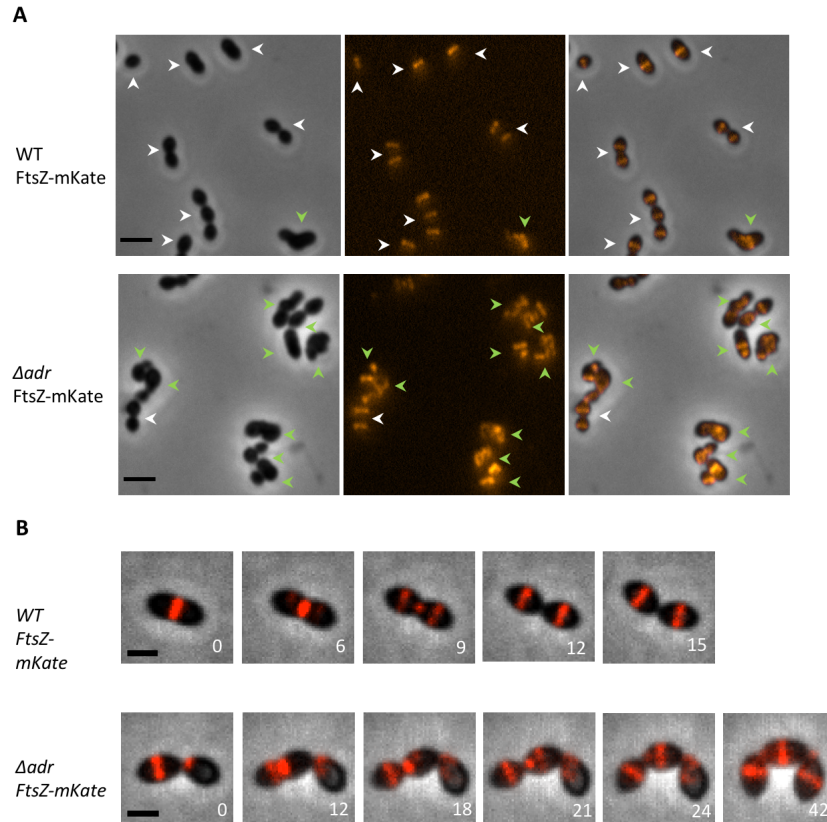
**FIGURE 5.12 – Mislocalization of Adr-sfGFP and FtsZ-mKate2 in  $\Delta mapZ$  and  $\Delta gpsB$  cells.** **A.** Adr-sfGFP and FtsZ-mKate2 localizations in  $\Delta mapZ$  cells. Phase contrast (grey), GFP fluorescent signal (green), mKate2 (red) and merge (right) images are shown. Scale bars 2  $\mu$ m. **B.** Adr-sfGFP and FtsZ-mKate2 localizations in  $\Delta gpsB$  cells. Phase contrast (grey), GFP fluorescent signal (green), mKate2 (red) and merge (right) images are shown. Scale bars 2  $\mu$ m.

division site and locates FtsZ through direct protein-protein interactions (FLEURIE et al., 2014b) and the essential protein GpsB that is involved in the early closure of the septal ring (LAND et al., 2013; FLEURIE et al., 2014b). The localizations of Adr-sfGFP and FtsZ-mKate2 were analyzed in the  $\Delta mapZ$  and  $\Delta gpsB$  backgrounds (Fig. 5.12, p.117). FtsZ-mKate2 displayed helical organization and ladder-like positioning in  $\Delta mapZ$  and  $\Delta gpsB$  strains, respectively, as already described (FLEURIE et al., 2014b; FLEURIE et al., 2014a; LAND et al., 2013). Interestingly, Adr-sfGFP perfectly co-localized with FtsZ-mKate2 in these two strains (Fig. 5.12, p.117). It is worth mentioning that no significant alteration of Adr positioning was observed in  $\Delta pbp1a$ ,  $\Delta pbp2a$ ,  $\Delta pbp1b$  and  $\Delta pbp3cter$  strains (Fig. 5.13, p.118, supplemental) (PAIK et al., 1999; SCHUSTER, DOBRINSKI et HAKENBECK, 1990).

FtsZ-mKate2 was expressed in  $\Delta adr$  cells and 79,5% (n=565) of those cells present abnormal morphologies and FtsZ defects positioning compared to only 12,3% (n=553) of the WT cells expressing FtsZ-mKate2 (Fig. 5.14A, p.119). In addition, time-lapse images of FtsZ-mKate2 show efficient cell division and septal localization in WT cells while aberrant division and morphological defects appear in the  $\Delta adr$  strain together with altered FtsZ-mKate2 positioning (Fig. 5.14B p.119 and Supplementary Video 3). In conclusion, the expression of FtsZ-mKate2 in  $\Delta adr$  cells induces a more severe phenotype than in the WT cells indicating that this fusion is not fully functional. The partial loss of GFP function when it is fused to fluorescent protein has already been reported (MARTEYN et al., 2014). Altogether, these data



**FIGURE 5.13** – Localization of Adr-sfGFPop in *Δpbp1a*, *Δpbp1b*, *Δpbp2a* and *Δpbp3Cter* pneumococcal cells. Green fluorescent signal (left), phase contrast (middle) and merge (right) images are shown. Scale bar, 2  $\mu$ m.



**FIGURE 5.14 – Mislocalization of FtsZ-mKate2 in  $\Delta$ *adr* cells.** **A.** FtsZ-mKate2 localization in WT and  $\Delta$ *adr* cells. Phase contrast (left), red fluorescent signal (middle) and merge (right) images are shown. White arrow heads point to cells of normal morphology and septal localization of FtsZ while green arrow heads point to cells displaying aberrant shape and mislocalization of FtsZ. Scale bar 2  $\mu$ m. **B.** Distribution of the length parameter (upper panel) and width parameter (lower panel) of  $\Delta$ *adr* cells (n=1786) compared to  $\Delta$ *adr* cells expressing FtsZ-mKate2 (n=928). Measurements were performed on phase-contrast images using MicrobeTracker. **C.** Fluorescence time-lapse microscopy of WT cells producing FtsZ-mKate2 and  $\Delta$ *adr* cells expressing FtsZ-mKate. Overlays between phase contrast (grey), GFP (green) and mKate2 (red) are shown. Stills are from Movie S3. Scale bar 2  $\mu$ m.



show that in WT cells and in division mutants, Adr and FtsZ co-localize, strongly suggesting that the function of Adr is related to the cell division process.

### 5.2.5 Discussion

Deletion of *adr* gene encoding an O-acetylase increases LytA-dependent lysis of *S. pneumoniae*. From these results, we infer that O-acetylation of MurNAc residues protects PG from cleavage of the amide bond by LytA. In addition, the absence of Adr increases sensibility to penicillin. This implies a functional relationship between peptidoglycan O-acetylation and its cross-linking. Furthermore, the O-acetylation Adr localizes at the septal site and adopts aberrant positioning in cell division mutants, indicating that O-acetylation is functionally related to cell division. We propose that Adr is an important player of the pneumococcal division process by promoting the formation of robust and mature peptidoglycan, although we cannot formally exclude a minor compensatory effect of other activities in peptidoglycan metabolism.

LytA cleaves the amide bond between MurNAc and L-alanine (HOWARD et GOODER, 1974) and is responsible for the pneumococcal autolysis launched at the end of the stationary phase. Although LytA acts at the cell surface, the mechanism of its export remains unclear since no peptide signal is present in its sequence. Recently, it was shown that LytA is released during exponential growth phase and accumulates at the cell surface all along the stationary phase until a threshold concentration (proposed to be about 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) is attained and initiates the lysis process (MELLROTH et al., 2012). Pneumococcal cells are protected from the amidase activity of LytA during the exponential growth phase but these protective features are lost when the peptidoglycan biosynthesis machinery is stopped upon entry into the stationary phase or by nutrient depletion or antibiotic targeting the machinery (TOMASZ et WAKS, 1975; MELLROTH et al., 2012).

Despite the long-standing identification of the role of LytA as the major pneumococcal autolysin, the molecular mechanisms of its regulation are still largely misunderstood, although our data suggest that the O-acetylation of the PG might be involved in this process.

O-acetylation reaction must be performed on nascent peptidoglycan since no O-acetylated groups has been detected on the precursor lipid II (see VOLLMER et al., 2008 for review). Our data suggest that O-acetylation of MurNAc is related to peptidoglycan formation since inhibition of the transpeptidase activity of PBPs by penicillin resulted in an increase of LytA activity. We thus propose that Adr function is tightly related to the cross-linking of newly polymerized glycan chains

and that the joined O-acetylation and transpeptidation reactions contribute to form a robust peptidoglycan structure. Interestingly, a sum of observations reviewed in 2008 (VOLLMER et al., 2008) and yet not updated led to the same hypothesis, i.e., peptidoglycan O-acetylation would be linked to the cross-linking of peptidoglycan. It was shown that the level of peptidoglycan O-acetylation was decreased after incubation with penicillin in *S. aureus* (SIDOW, JOHANNSEN et LABISCHINSKI, 1990) and *Proteus mirabilis* (MARTIN et GMEINER, 1979). In *N. gonorrhoeae*, this same effect was shown to be associated to the inhibition of PBP2 (DOUGHERTY, 1983; DOUGHERTY, 1985). Moreover, in a penicillin-resistant strain of *S. pneumoniae*, the absence of Adr resulted in the loss of O-acetylation and in the reduction of the minimal inhibitory concentration of penicillin, indicating that O-de-acetylated peptidoglycan is more sensitive to the lysis induced by penicillin (CRISOSTOMO et al., 2006). We observed a comparable phenotype although a penicillin-sensitive strain was used. Altogether, the data presented here suggest that O-acetylation is an important step in the synthesis of fully structured peptidoglycan. As illustrated in Fig. 5.15 p.123, we propose that O-acetylation and transpeptidation activities are functionally related.

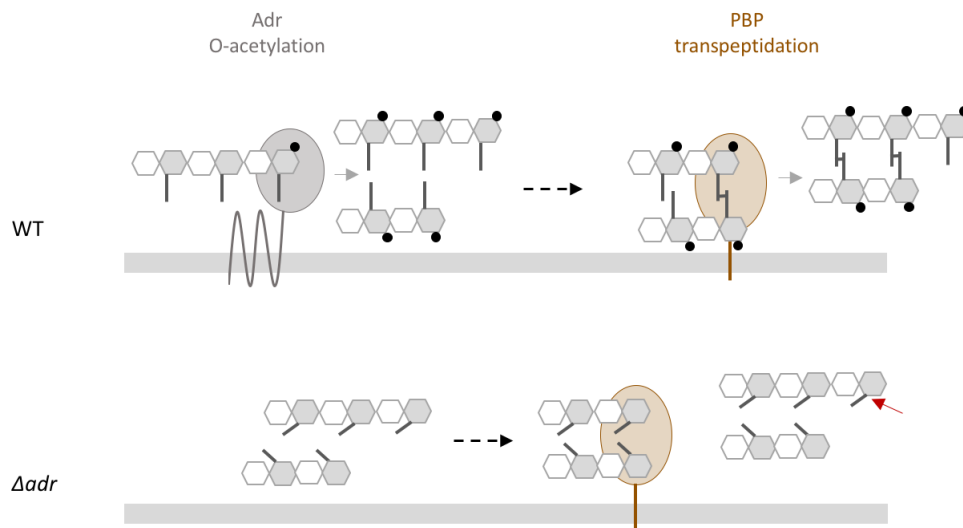
We investigated the role of O-acetylation in cellular division and we show that indeed, Adr protein actively participates in the pneumococcal division process. To our knowledge, this is only the second example of such investigation together with OatA in *Lactobacillus plantarum*, which has been shown to control cell septation independently of its O-acetyltransferase activity (BERNARD et al., 2012).

$\Delta adr$  pneumococcal cells display defects in the cell wall structure and in the septation process. Interestingly, cell division alterations and aberrant FtsZ localizations are observed in the  $\Delta adr$  mutant indicating that Adr and FtsZ activities are jointly required for efficient pneumococcal division. The positioning of Adr in pneumococcal cells is reminiscent of proteins acting in the division process, like FtsZ, StkP and PBPs (MORLOT et al., 2003; JACQ et al., 2015; MORLOT et al., 2013). Like StkP and PBPs, the septal localization of Adr lags just behind FtsZ, which itself is beacons by MapZ (FLEURIE et al., 2014b). Monitoring of peptidoglycan synthesis by incorporation of the HADA fluorescent label by the PBPs further showed that at the mid-division stage, Adr migrates to the future division sites before peptidoglycan synthesis takes place, i.e. before the future division sites of daughter cells are marked by HADA. Adr localization timing is thus compatible with a concerted action with the PBPs and is in agreement with the idea that peptidoglycan O-acetylation is an important reaction in the process of peptidoglycan synthesis and maturation, and

in cell division. Future experiments will aim at determining whether the role of Adr in cell wall synthesis and division involves its enzymatic activity and/or molecular interaction with components of the division machinery.

## **Acknowledgments**

This work used the platforms of the Grenoble Instruct centre (ISBG ; UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANRS-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology. J.B. received a PhD fellowship from the French Ministry of Education and Research. The electron microscopy facility is supported by the Rhône-Alpes Region, the Fondation pour la Recherche Médicale, the fonds FEDER, the Centre National de la Recherche Scientifique, the CEA, the UGA, the EMBL and the GIS-Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie.



**FIGURE 5.15 – Figure 8. Model of the functional interplay between O-acetylation and transpeptidation.** Adr protein which catalyzes the O-acetylation reaction is represented as a multimembrane protein (for details, see Fig 5.11A, supplemental). Only one PBP is represented as a bitopic membrane protein with the catalytic domain exposed in the extracellular space. For clarity reason, the represented PBP only refers to the transpeptidation reaction, the glycan chain polymerization activity is not shown. The grey bar accounts for the cytoplasmic membrane. The peptidoglycan glycan chains are formed by the repetition of MurNAc and GlcNAc, grey and white hexagons, respectively. Peptide stems (grey lines) are linked to MurNAc and cross-linked to each others (transversal lines). O-acetylation of MurNAc residues is represented by black circles. Light grey arrows indicate O-acetylation and transpeptidation reactions. The dotted black arrow illustrates the fact that O-acetylation of MurNAc would precede peptides cross-linking in our working model. Non cleavage of the amide bond by LytA in O-acetylated peptidoglycan is indicated by a diamond red arrow, while cleavage when peptidoglycan is O-de-acetylated is represented by a red arrow. In dividing WT cells (exponential growth, peptidoglycan synthesis), Adr O-acetylates MurNAc residues on glycan strands before the transpeptidation takes place to produce mature peptidoglycan. In such structure, the amide bond is not accessible, impeding its cleavage by LytA and thus conferring resistance towards cell lysis. The absence of Adr ( $\Delta adr$  strain) induces alteration of the peptidoglycan structure, which in turns affects the transpeptidation efficiency, increases the sensitivity to LytA cleavage, alters the cell morphology and impacts the division process (the latter two features are not represented in the figure).



# 6

## Specific and spatial labeling of choline-containing teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* by click chemistry

### Sommaire

---

<b>6.1</b>	<b>Contexte</b>	<b>126</b>
<b>6.2</b>	<b>Publication</b>	<b>128</b>
6.2.1	Résumé	129
6.2.2	Introduction and results	130
6.2.3	Methods	138
6.2.4	Supplements	142

---

## 6.1 Contexte

La paroi des bactéries à Gram positif est composée d'une quantité environ égale de peptidoglycane (PG) et d'acides téichoïques (TA). Les TA sont essentiels car ils jouent des rôles importants dans la physiologie bactérienne, notamment au niveau du processus de division et de biosynthèse de la paroi. En effet, la déplétion des TA induit des défauts morphologiques, des irrégularités dans l'épaisseur de la paroi et un positionnement aberrant du septum. Ces observations suggèrent que la biosynthèse des TA est coordonnée à celle du PG. De plus, les défauts de septation et de séparation des cellules mutantes impliquent un rôle des TA dans la localisation, la stabilité et/ou l'activité des hydrolases du PG.

En dépit de l'importance des TA, les mécanismes moléculaires sous-jacents à leurs fonctions biologiques sont peu connus. De façon générale, l'étude de ces glycopolymères est encore peu étendue principalement à cause du manque de méthodes efficaces et d'outils appropriés. La détermination de leur organisation tridimensionnelle dans les cellules vivantes serait en particulier une étape importante dans la compréhension de leur fonction. Afin de répondre à ces problématiques, nous avons développé une méthode innovante de marquage des TA des cellules vivantes en combinant les approches de chimie click et de microscopie à fluorescence.

Plusieurs propriétés spécifiques de *Streptococcus pneumoniae* ont permis de développer cette technique. Premièrement, les TA de *S. pneumoniae* sont décorés par des phosphorylcholines. Ces résidus de choline servent d'ancrage pour les choline-binding proteins (CBPs), une classe de protéines ayant des fonctions variées et importantes pour la physiologie bactérienne (cf chapitre 2.1.4 page 36). La choline n'est pas rare chez les bactéries, mais *S. pneumoniae* est la seule espèce connue pour laquelle la croissance est entièrement dépendante de la présence de choline exogène. Et deuxièmement, la choline est exclusivement présente dans les TA de *S. pneumoniae* et n'est pas incorporée dans sa membrane sous forme de phosphatidylcholine comme c'est le cas chez certaines bactéries (GEIGER, LÓPEZ-LARA et SOHLENKAMP, 2013). Cette spécificité a donc été exploitée pour la synthèse et l'utilisation d'une choline modifiée possédant un groupement chimique rapporteur azoture pouvant se lier covalamment à une sonde fluorogénique fusionnée à un alcyne par cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre (CuAAC), permettant le marquage spécifique des TA.

Nous avons ainsi montré que les molécules de choline modifiées sont métabolisées par le pneumocoque et incorporées aux molécules de TA. Le marquage fluorescent par réaction bioorthogonale indique une localisation de la synthèse des TA au site de division. Cette méthode de marquage des TA est spécifique de *S. pneumoniae* et pourrait être exploitée comme outil d'identification. Ce travail est le premier rapport

de marquage métabolique des TA et ouvre le champ à l'exploitation des problématiques mécanistiques de la biosynthèse des TA dans un contexte physiologique.



## 6.2 Publication

### Specific and spatial labeling of choline-containing teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* by click chemistry.

Anne Marie Di Guilmi<sup>[a][b]</sup>, Julie Bonnet<sup>[a]</sup>, Stefan Peißert<sup>[a]</sup>, Claire Durmort<sup>[a]</sup>, Benoit Gallet<sup>[a]</sup>, Thierry Vernet<sup>[a]</sup>, Nicolas Gisch<sup>[c]</sup>, and Yung-Sing Wong<sup>[d]</sup>

Article accepté dans Chemical Communications le 4 Septembre 2017

DOI : 10.1039/C7CC05646J

Lien vers la version publiée :

<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/cc/c7cc05646j>

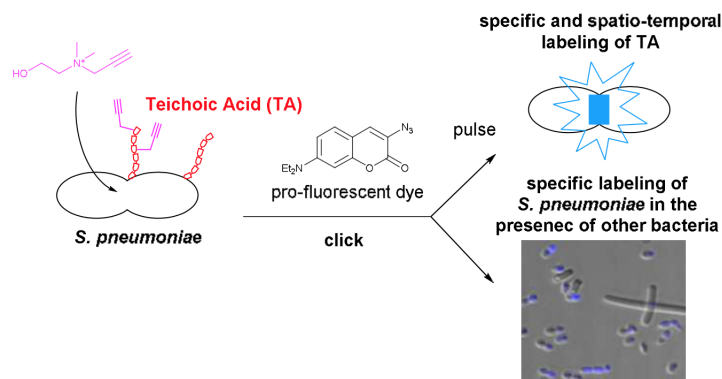
<sup>[a]</sup> Institut de Biologie Structurale (IBS), Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, 38 044, Grenoble, France

<sup>[b]</sup>(present address) CEA Fontenay-aux-roses, DRF/IRCM/SIGRR/LRIG, BP6-18 route du panorama, 92265 Fontenay-aux-roses cedex, France e-mail : anne-marie.di-guilmi@cea.fr

<sup>[c]</sup> Division of Bioanalytical Chemistry, Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Biosciences, Parkallee 1-40, 23845 Borstel, Germany

<sup>[d]</sup> Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM) Univ. Grenoble Alpes, UMR 5063 CNRS, ICMG FR 2607 470 rue de la Chimie, 38 041, Grenoble, France e-mail : yung-sing.wong@univ-grenoble-alpes.fr

#### Graphical abstracts



**FIGURE 6.1** – A new metabolic pathway was exploited to label for the first time teichoic acid (TA) of *Streptococcus pneumoniae* cell wall

### 6.2.1 Résumé

La propargyl-choline a été efficacement incorporé dans les polymères de TA à la surface du pathogène humain *Streptococcus pneumoniae*. Ce nouveau mécanisme de marquage métabolique bactérien couplé à l'utilisation de la chimie click fluorescente offre une opportunité unique d'étudier la biosynthèse spatio-temporelle des TA. Nous avons montré que leur synthèse se localise au site septal ce qui suggère que les synthèses des TA et du PG sont reliées. De plus, le pattern de localisation représentatif de *S. pneumoniae* a permis la détection spécifique de ce pathogène en culture avec d'autres espèces bactériennes.

### Abstract

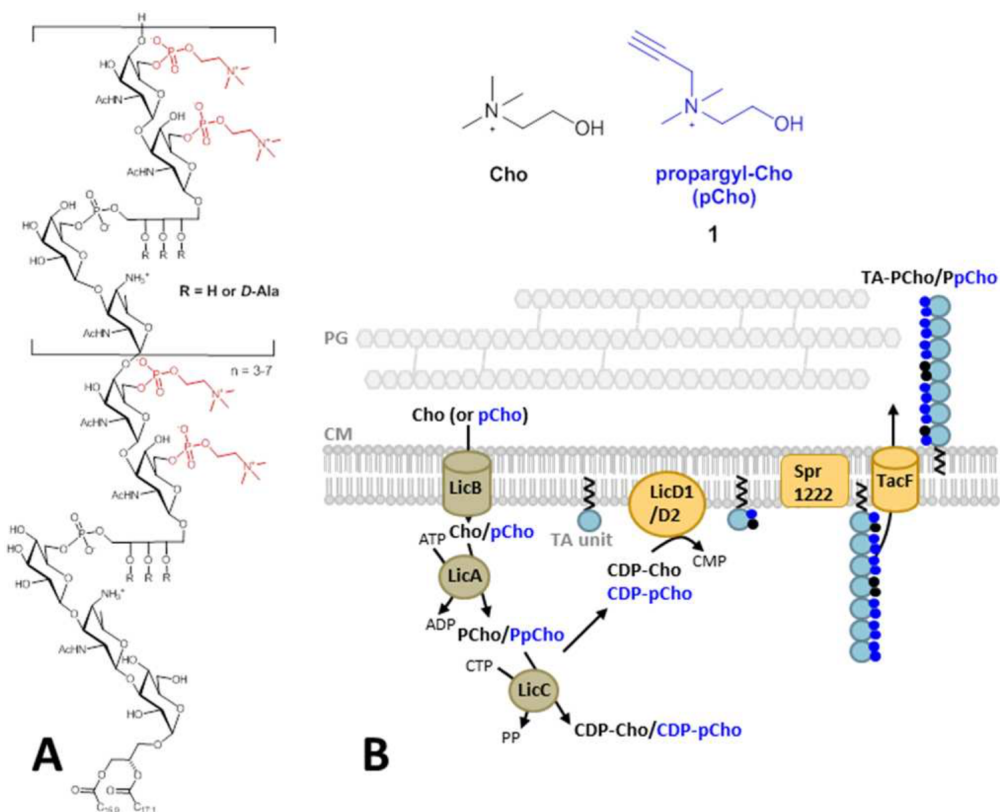
Propargyl-choline was efficiently incorporated into the teichoic acid (TA) polymers on the surface of the human lung pathogen *Streptococcus pneumoniae*. This new bacterial metabolic labeling pathway coupled with fluorescent click chemistry provides a unique opportunity to enlighten the spatio-temporal TA biosynthesis. We showed that the latter was localized at the septal site which suggests that TA and peptidoglycan (PG) syntheses are related to each other. The representative labeling pattern of *S. pneumoniae* allowed specific detection of the pathogen when mixed with other bacterial species.

## 6.2.2 Introduction and results

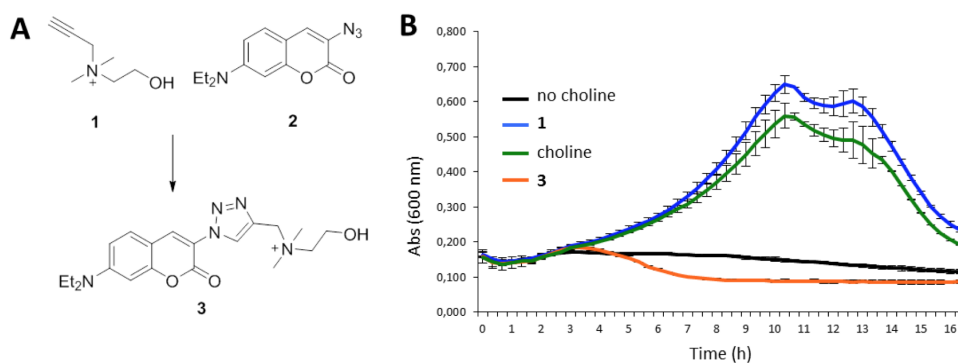
The bacterial cell wall is mainly composed of peptidoglycan, capsular polysaccharides and glycoproteins. These components form an organized matrix which is essential to cell integrity, making their biosynthesis a prime target for antibiotherapy (SARKAR et al., 2017; MÜLLER, KLÖCKNER et SCHNEIDER, 2017). PG is made from linear glycan chains of N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine residues cross-linked via peptide strands composed by *L*- and *D*-amino acids. Unlike most Gram-negative bacteria that contain lipopolysaccharides, the cell wall of Gram-positive bacteria is characterized by the presence of teichoic acids (TA). These glycopolymers, which can contain *D*-alanine residues, are either attached to the PG (wall teichoic acids, WTA) or anchored to the cytoplasmic membrane (lipoteichoic acid, LTA) (BROWN, SANTA MARIA et WALKER, 2013; PERCY et GRÜNDLING, 2014). In the human pathogenic Gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae*, WTA and LTA chains are produced in a common biosynthetic pathway, display identical structures and, more importantly, have the particularity of being decorated with phosphorylcholine (PCho) (red color, Figure 6.2A, page 131) (DENAPAITE et al., 2012; GISCH et al., 2013; TOMASZ, 1967). A number of pathogenic bacteria, nematodes and protozoa also contain PCho moieties which serve to decorate glycopolymers, glycolipids or secreted proteins (CLARK et WEISER, 2013; YOUNG, FOOTE et WAKARCHUK, 2013).

Knowledge about the dynamic and the localization of bacterial cell wall biosynthesis is however hampered by difficulties in having readily accessible tracers that are selective for each component. Metabolic labeling by incorporation of non-native substrates bearing functional groups, either a fluorescent dye or a group ready for click chemistry has emerged as a valuable and practical tool to label bacterial cell wall constituents (GAUTAM et al., 2013; TRA et DUBE, 2014; SIEGRIST et al., 2015; KOCAOGLU et CARLSON, 2016).

Modified glycans or *D*-amino acids are typically used. The rapid metabolic incorporation of modified *D*-amino acids by bacteria makes this approach particularly suitable to investigate spatio-temporal labeling of PG (KURU et al., 2012; SIEGRIST et al., 2013; KURU et al., 2015; HSU et al., 2017). However, modified *D*-amino acids may be incorporated into TA and PG. We wondered whether the dependency of *S. pneumoniae* from choline could be a new gateway to selectively trace the pneumococcal TA biosynthesis and localization in the cell wall, considering that choline is rapidly metabolized and incorporated in TA, and not in membranes as phosphatidylcholine (PC) (SOHLENKAMP, LÓPEZ-LARA et GEIGER, 2003). Inter-



**FIGURE 6.2** – **A.** Structure of lipoteichoic acid (LTA) in the Gram-positive bacterium *S. pneumoniae* (adapted from GISCH et al., 2013); **B.** Decoration of pneumococcal TA by phosphorylcholine (PCho) (adapted from DENAPATE et al., 2012) or phosphoryl-propargyl-choline (PpCho). The membrane protein LicB imports choline (Cho) or propargyl-choline (pCho) into the cytoplasm, which is subsequently activated by LicA and LicC. LicD1 and LicD2 are two proteins associated to the membrane that decorate the lipid-linked TA precursor with PCho or PpCho. The membrane protein Spr1222 polymerizes TA chain, which is then flipped across the membrane by TacF. These three proteins (orange color, adapted from EBERHARDT et al., 2009) are encoded by the *lic2* operon. Normal Cho and pCho as well as their phosphorylated counterparts (PCho, PpCho) are represented in black and blue colors, respectively. PG : peptidoglycan, CM : cytoplasmic membrane, TA : Teichoic Acid, TA-PCho/PpCho : Teichoic Acid decorated with PCho and PpCho.



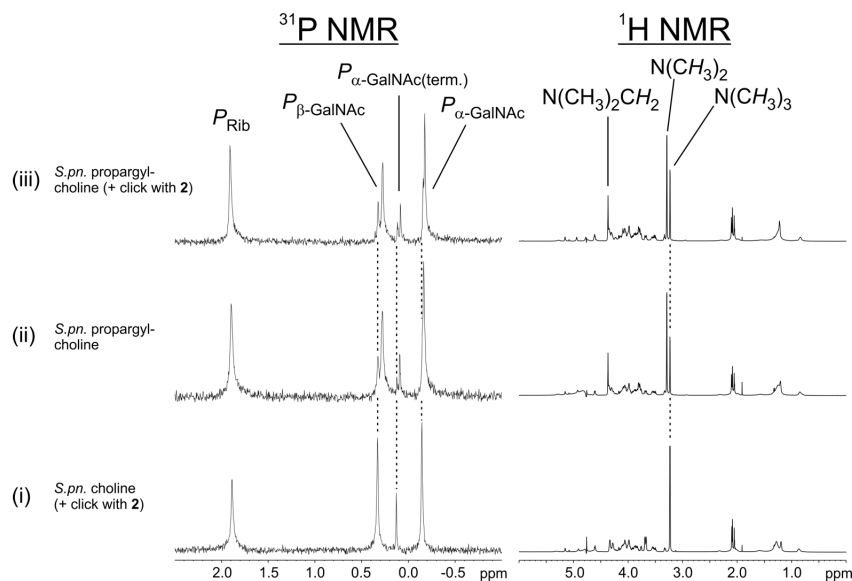
**FIGURE 6.3** – **A.** Synthesis of fluorescent-choline **3** from propargyl-choline **1** and azido-coumarin **2** : Amberlyst-A21 CuI cat., CH<sub>3</sub>CN, 24 h, 95%. **B.** *S. pneumoniae* growth rates with choline or its derivatives **1** or **3** (added at 10  $\mu$ g/mL in the culture medium).

estingly, modified-cholines have been used as metabolic cell surface tracers to label membranes with high-content of PC like mammalian cells (JAO et al., 2009; LI et al., 2014) and viruses (HUANG et al., 2013).

In this study, we report the selective, rapid and significant incorporation of modified-choline in *S. pneumoniae* and its subsequent ligation with a fluorogenic probe by CuAAC, a procedure that enables the imaging of TA. In addition, this approach allowed for the first time to correlate the location of nascent TA with the cell division site. This specific labeling was further exploited to selectively detect *S. pneumoniae* among other bacterial species.

The choline dependency for pneumococcal growth was exploited to validate the metabolic incorporation of modified cholines (Scheme 6.3A, page 132). Propargyl-choline **1** (JAO et al., 2009) was evaluated as well as its corresponding fluorescent analogue **3** obtained by the click reaction between **1** and **2** (SIVAKUMAR et al., 2004). One interesting aspect of the reporter **2** comes from its fluorogenic property. Once coupled with alkyne, the fluorescence signal is amplified and the background interference is reduced (KELE et al., 2009). A nonpathogenic (unencapsulated) pneumococcal R6 strain was cultured in C-medium containing propargyl-choline **1** or normal choline. Comparable growth rates were observed in the presence of normal choline and of propargyl-choline **1** indicating a good metabolization of the latter compound. Conversely, the bacteria did not grown in the presence of compound **3** suggesting that the metabolization of a fluorescent choline is not feasible.

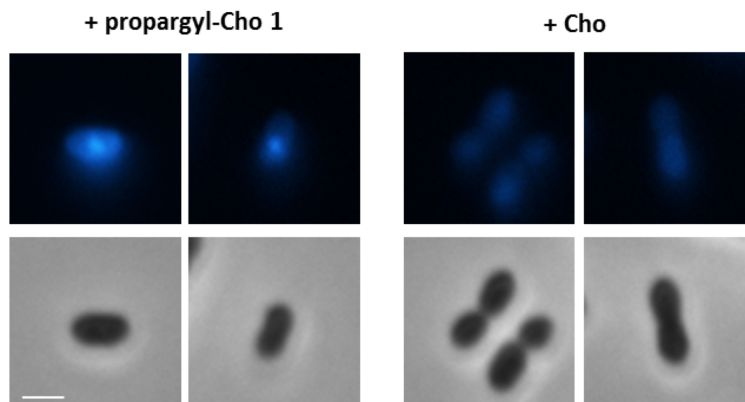
Analytical characterization and quantification of TA decorated by propargyl-choline **1** has been realized. Pneumococcal cultures grown in presence of **1** or normal choline for 3 h were processed to extract LTA and the WTA-PGN complex after LytA-treatment, respectively, and analyzed by NMR. <sup>31</sup>P and <sup>1</sup>H NMR spectra



**FIGURE 6.4** – Sections of  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\delta\text{P}$  2.5-(-1.0)) and  $^1\text{H}$  NMR (water suppressed;  $\delta\text{H}$  6.0-0.0)) spectra of native LTA preparations, isolated from *S. pneumoniae* grown in the presence of (i) normal choline (and performed bioorthogonal reaction with **2**), (ii) propargyl-choline **1** and (iii) propargyl-choline **1** (and performed bioorthogonal reaction with **2**). Incorporation of **1** is proven by the occurrence of the additional signals in panels (ii) and (iii).

clearly showed that propargyl-choline **1** has been integrated in LTA (Figure 6.4, page 133, spectra (ii)) and accounted for about 75% of the total choline incorporated (Figure 6.10 page 144, supplemental) compared to normal choline growth conditions (Scheme 6.4, page 133, spectra (i)). This ratio was also determined in WTA extracts and revealed an even slightly higher rate of propargyl-choline incorporation (77-88%, Figures 6.10-6.12; NMR chemical shift data in Table 6.16 page 149), corroborating the common biosynthetic pathway of LTA and WTA.

Since propargyl-choline **1** was efficiently incorporated into TA, bioorthogonal reaction was performed on cells grown in the presence of **1** using the pro-fluorescent probe **2**. Fluorescent labeling of TA was observed by epifluorescence microscopy. However, to prevent any modification of the structure of TA and/or their eventual re-localization at the cell surface during the chemical labeling, a preliminary study was performed with fixed cells. After fixation, cells exposing propargyl-choline **1** were treated for 16 h with **2** (1 mM) in the presence of sodium ascorbate and a catalytic amount of  $\text{CuSO}_4$ . Fluorescence was specifically detected on cells grown in the presence of propargyl-choline **1** (+ propargyl-Cho, Figure 6.5, page 134) when compared with cells grown in the presence of normal choline (+ Cho). Isolation and chemical analysis of LTA was also carried on cells exposing propargyl-choline **1** submitted to bioorthogonal reaction with **2**. A fluorescence signal was indeed observed



**FIGURE 6.5** – Detection of metabolically incorporated propargyl-choline **1** in *S. pneumoniae* fixed cells. Growth was performed in the presence of propargyl-choline **1** (+ propargyl-Cho) or with normal choline (+ Cho) for 3 h, followed by orthogonal reaction with **2** for 16 h (cat. CuSO<sub>4</sub>, sodium ascorbate). Phase contrast and fluorescence images are shown. Scale bar = 1  $\mu$ m

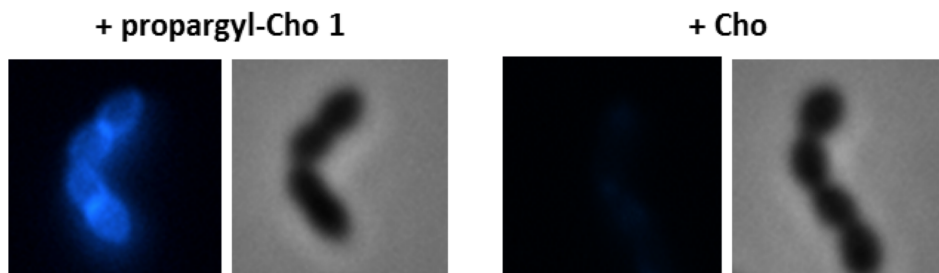
on the isolated LTA (see chromatograms of HIC purification (Figure 6.13 page 147) and respective LTA samples within NMR tubes under fluorescence excitation (Figure 6.14 page 148)). However, no association of **2** could be detected on the NMR spectra (Figure 6.4, page 133 and 6.11 page 145, spectra (ii)) suggesting that the grafting rate of **2** is low despite the presence of about 75% of propargyl-choline in these TA preparations.

Labeling of live pneumococcal cells is requested to gain insights into the TA biosynthesis dynamic. To limit the toxic effect of copper, optimization of the labeling conditions was performed. The concentration of copper was lowered to 50  $\mu$ M and the catalyst tris.

The addition of the accelerating catalyst (3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine (THPTA) was added to shorten the incubation time for click reaction to 30 min. Specific fluorescent labeling of TA was observed (Figure 6.6, page 135).

The fluorescence intensity displayed by pneumococcal cells grown in presence of propargyl-choline **1** was measured and compared to the signal detected on cells grown with normal choline in five independent experiments ( $n = 155$  to  $2445$  in each experiment and for each culture condition). Increase in the fluorescence signal of bacteria treated with propargyl-choline **1** compared with those with normal choline was more than four folds ( $4.28 \pm 0.8$ ). The surface cell is uniformly labeled although a brighter fluorescence was observed at the mid-cell position which might arise from the contact between the daughter cells membranes.

Based on this fast labeling protocol, a pulse experiment was performed to localize freshly incorporated propargyl-choline **1** and to explore the dynamic of TA

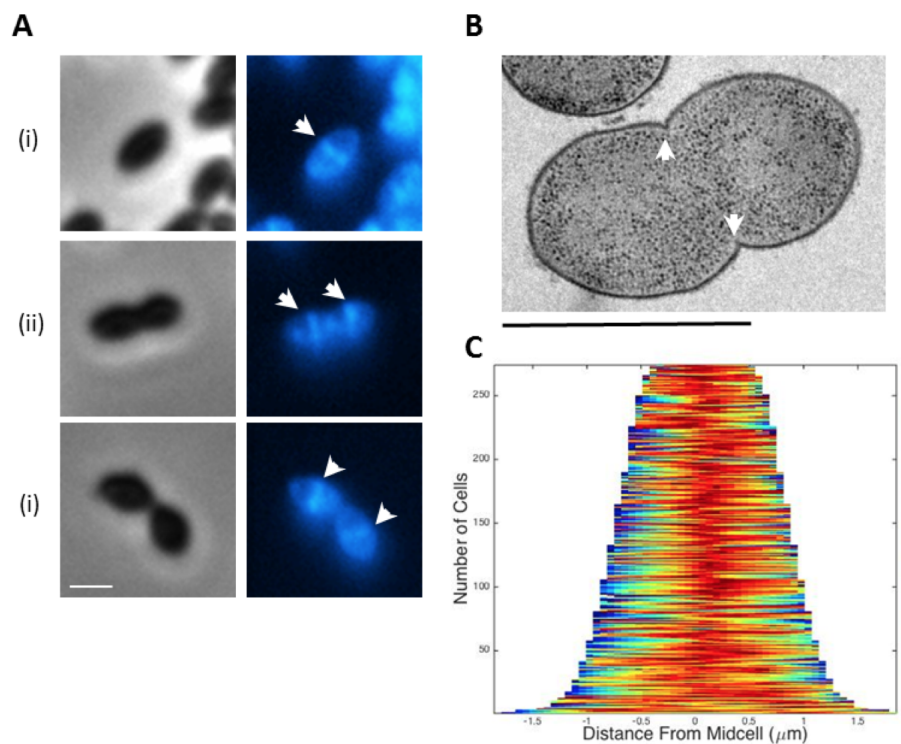


**FIGURE 6.6** – Detection of metabolically incorporated propargyl-choline **1** in live *S. pneumoniae* cells after bioorthogonal reaction with **2** for 30 min (cat. CuSO<sub>4</sub>, cat. THPTA, sodium ascorbate) compared to the growth with normal choline (Cho).

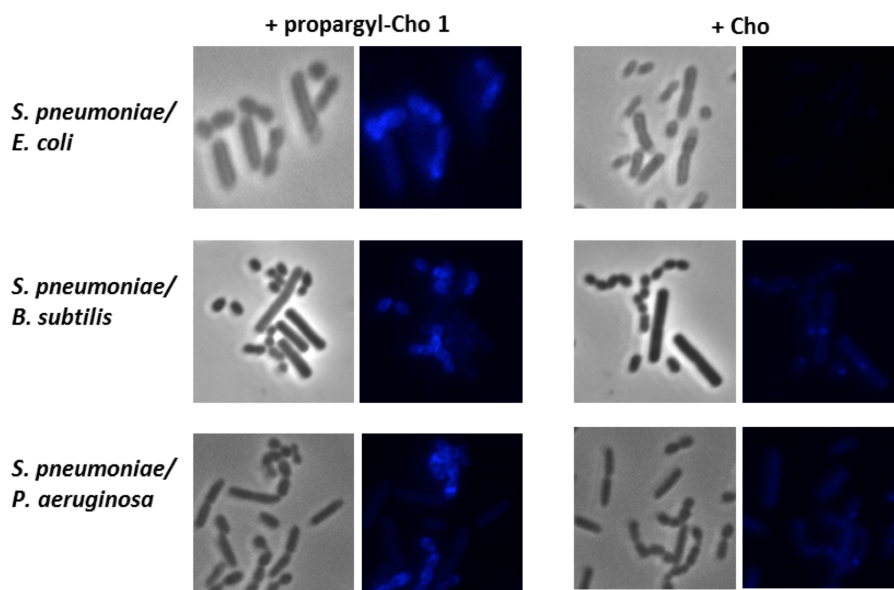
biosynthesis. Pneumococcal cells were grown in medium containing choline, washed, incubated in presence of propargyl-choline **1** for 30 min and submitted to the bioorthogonal reaction (30 min) (Figure 6.7, page 136). In these conditions, only TA synthesized during the 30 min pulse were labeled. Bright fluorescent signals were observed at the mid-cell position in early (panels (i), Figure 6.7A) and late division stages (panel (ii)). An electron micrograph of a pneumococcal cell at division stage (i) is shown to appreciate in details the cellular topology (Figures 6.7B). Early-division stage (i) is characterized by the on-set of cross-wall PG synthesis and membrane invagination (Figure 6.7B, white arrow heads). TA labeling was observed at the septal site (Figure 6.7A, white arrow heads) indicating that TA are synthesized and/or flipped across the membrane at the same time and the same place where PG synthesis takes place. Image analysis of a cell population confirms the septal localization of the TA labeling on pneumococcal cells over the cell cycle (Figure 6.7C).

The specific and quick labeling of *S. pneumoniae* makes this methodology applicable to pathogenic bacteria detection (HUDAK et al., 2017; LIANG et al., 2017; MASPONS et al., 2014) with significant assets like operating simplicity, use of tractable reagents and rapid diagnosis. We selected three bacterial species : *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, as Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively, that do not metabolize choline, and *Pseudomonas aeruginosa*, as a Gram-negative bacteria capable of metabolizing choline to phosphatidylcholine resulting for up 4% of the total phospholipid content (GEIGER, LÓPEZ-LARA et SOHLENKAMP, 2013) (Figure 6.8, page 137). Each bacterial species was grown independently in the presence of propargyl-choline **1** or choline and mixed before bioorthogonal reaction. In all cases, only *S. pneumoniae* was fluorescently labeled (Figure 6.8, page 137), indicating that this method allows specific detection of the pneumococcus in presence of other bacteria.





**FIGURE 6.7** – TA metabolic labeling on *S. pneumoniae* live cells after 30-min pulse of propargyl-choline **1**. **A.** Numbers (i) and (ii) refer to the different stages of division. Septal TA labeling is indicated by white arrow heads. Phase contrast and fluorescence images are shown. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ . **B.** Electron micrographs of pneumococcal cells at division stage (i) as shown in A. **C.** Demograph (signal profile representation in cells arranged by increasing cell length) of a pneumococcal cell population grown in the presence of **1** for 30 min and submitted to the bioorthogonal reaction that shows the mid-cell positioning of TA.



**FIGURE 6.8** – Specific detection of metabolically incorporated propargyl-choline **1** in live *S. pneumoniae* cells. Cultures of *E. coli*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa* were performed as for *S. pneumoniae* in the presence (+ propargyl-Cho) or in the absence (+ Cho) of propargyl-choline **1**. Cultures were mixed as indicated on the left hand side of the figure and processed for biorthogonal reaction.

To the best of our knowledge, this work is the first report of metabolic labeling of Gram-positive TA. By exploiting a specific bacterial metabolic pathway, the choline-growth dependency of *S. pneumoniae*, we demonstrated the fast metabolization and high incorporation of modified choline to TA and the specificity of the labeling approach based on the click chemistry. Short labeling pulses with propargyl-choline **1** were able to label TA in live cells at the septal site and showed that TA synthesis might be correlated to PG synthesis and the cell division. The success of this method was applied for the rapid and selective detection of *S. pneumoniae* among other bacteria, and offers even broader possibility to explore mechanistic issues of pneumococcal TA biosynthesis in a more physiological context.

**Acknowledgements** We thank S. Thomsen (TA isolation) and H. Käßner (NMR) (both RC Borstel) for their excellent technical assistance. This work used the platforms of the Grenoble Instruct centre (ISBG ; UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANRS-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). Labex AR-CANE (ANR-11-LABX-003) is also acknowledged. The electron microscopy facility is supported by the Rhône-Alpes Region, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), the fonds FEDER, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Commissariat à l’Energie Atomique (CEA), the University of Gre-

noble Alpes (UGA), the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) and the GIS-Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBISA).

### 6.2.3 Methods

#### Chemicals and instruments

All starting materials were obtained from commercial sources and were used without further purification. Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine (THPTA) was purchased by Sigma-Aldrich. NMR spectra were performed for small molecules on a Bruker Advance 400 MHz for  $^1\text{H}$ -NMR spectra and 100 MHz for  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra. Chemical shifts are reported in ppm ( $\delta$ ) relative to the solvents :  $^1\text{H}$   $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 3.3$  ppm,  $^{13}\text{C}$   $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 49.15$  ppm. Accurate mass spectra were recorded on a time-of-flight (TOF) spectrometer (Waters, XEVO G2-S QToF). NMR spectroscopic measurements of native LTA or PG-WTA preparations were performed in D<sub>2</sub>O at 300 K (LTA) or 307 K (PG-WTA) on a Bruker AvanceIII 700 MHz spectrometer (equipped with an inverse 5 mm quadruple-resonance Z-grad cryoprobe). Deuterated solvents were purchased from Deutero GmbH (Kastellaun, Germany). Acetone was used as an external standard to calibrate  $^1\text{H}$  ( $\delta\text{H}$  2.225) and  $^{13}\text{C}$  ( $\delta\text{C}$  30.89) NMR spectra.  $^{31}\text{P}$  NMR spectra ( $\delta\text{P}$  0.0) were calibrated with 85% phosphoric acid in D<sub>2</sub>O as an external standard.  $^1\text{H}$  NMR assignments were confirmed by two-dimensional  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY and TOCSY experiments, and  $^{13}\text{C}$  NMR assignments were indicated by two-dimensional  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC, based on the  $^1\text{H}$  NMR assignments. Inter-residual connectivity and further evidence for  $^{13}\text{C}$  assignment were obtained from two-dimensional  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  heteronuclear multiple bond correlation and  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC-TOCSY experiments. Phosphate group connectivity was assigned by two-dimensional  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  HMQC and  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  HMQC-TOCSY. All data were acquired and processed using Bruker TOPSIN V 3.0 or higher.

**Compounds** : N-(2-hydroxyethyl)-N,N-dimethylbut-3-yn-1-aminium bromide (propargyl-choline) **1** and 3-Azido-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one **2** were obtained according to previous reported syntheses.

N-((1-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-2-hydroxy-N,N-dimethylethan-1-aminium bromide (**3**) :

The propargyl-choline **1** (50 mg, 0.24 mmol) and the azido-coumarin **2** (69 mg, 0.27 mmol) were diluted in dry CH<sub>3</sub>CN (0.6 mL) and the polymer-supported Amberlyst-A21/CuI catalyst (17 mg) was added in one portion. After stirring overnight, the black solution is filtrated to remove the catalyst. The solvent was evaporated and the product was directly purified (silica gel, 10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to give

3 (107 mg, 0.23 mmol, 95%) as a yellow solid. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 1.19 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H), 3.28 (s, 6H), 3.46 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H), 3.62 (m, 2H), 4.13 (m, 2H), 4.93 (m, 2H), 6.47 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.73 (dd, *J* = 9.0, 2.1 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.91 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 12.9 (2xCH<sub>3</sub>), 46.0 (2xCH<sub>2</sub>), 52.2 (2xCH<sub>3</sub>), 57.2 (CH<sub>2</sub>), 60.8 (CH<sub>2</sub>), 66.7 (CH<sub>2</sub>), 97.7 (CH), 108.1 (C), 111.7 (CH), 117.2 (C), 130.4 (CH), 131.9 (CH), 136.9 (C), 138.3 (CH), 153.6 (C), 157.5 (C), 158.7 (C). HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* calc. for C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M]<sup>+</sup> 386.2187, found 386.2185.

### Bacterial growth conditions

Liquid cultures of the unencapsulated pneumococcal strain R6 were grown at 37 °C/5%CO<sub>2</sub> in a chemically defined medium (C-medium), supplemented with 4 μg/mL choline (Cmed-choline). Note that contrary to the original composition, the C-medium used here did not contain neither yeast extract nor albumin. Cells were harvested by centrifugation at 3,320 x g for 10 min, washed three times with C-medium without choline, concentrated to OD<sub>600nm</sub> of 2 and stored at - 80 °C as aliquots containing 15% glycerol (v/v). For bioorthogonal reactions, 10 mL of Cmed-choline and 10 mL of C-medium containing 4 μg/mL of propargyl-choline 1 were inoculated at OD<sub>600nm</sub> of 0.05 with aliquots of cells conditioned in C-medium as described above. The growth was pursued for 3 h at 37 μ/5% CO<sub>2</sub> until OD<sub>600</sub> of 0.2-0.25 was reached, which corresponds to the early exponential growth phase. The cells were pelleted by centrifugation at 3,320 x g for 10 min and subsequently incubated with 500 μL of 2% choline chloride (w/v) for 10 min at room temperature to remove the Choline-Binding Proteins (CBPs) that bind to choline residues. In the case of choline-alkyl residues, the presence of CBPs might impair the labeling of those molecules by the pro-fluorescent azide reporter 2. The cells were washed twice with PBS (1 min centrifugation at 4,500 x g) and resuspended in 400 μL of PBS. A volume of 100 μL was used for each bioorthogonal reaction. In pulse experiments, cells were grown in Cmed-choline for 3 h, washed twice in PBS, resuspended in C-medium containing 4 μg/mL of propargyl-choline 1 and incubated at 37 °C/5% CO<sub>2</sub> for 30 min before proceeding to the labeling. *E. coli*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa* growth conditions in C-medium supplemented with both forms of choline were tested before conducting the click reactions with the same protocol as the one developed for *S. pneumoniae*.

### Copper catalyzed click chemistry

**Labeling in fixed cell condition** : Cell fixation was performed after culture har-

vest. Cells from 10 mL culture were washed twice with PBS, resuspended in 500  $\mu\text{L}$  of 4% (w/v) paraformaldehyde for 30 min at RT followed by a 2 h-incubation at 4  $^{\circ}\text{C}$ . After two washes with PBS, cells were resuspended in 400  $\mu\text{L}$  of PBS and aliquots of 100  $\mu\text{L}$  were used for the click reaction by adding 2 (1 mM), ascorbic acid (1 mM) and copper (II) sulfate (100  $\mu\text{M}$ ). The labeling proceeded for 16 h at room temperature under mild agitation and protected from the light. Labeled cells were washed twice with PBS and resuspended in PBS before microscopy observation.

**Labeling in live cell condition** : Labeling was performed on cells grown in presence of choline and propargyl-choline 1. A volume of 100  $\mu\text{L}$  of cell suspension prepared as described above was incubated with the following reagents, which final concentration is indicated : 2 (1 mM), sodium ascorbate (1 mM), copper (II) sulfate (50  $\mu\text{M}$ ), THPTA (tris (3-hydroxypropyltriazolylmethyl) amine) (300  $\mu\text{M}$ ) for 30 min at room temperature, under mild agitation and protected from the light. Labeled cells were washed twice with PBS and resuspended in PBS for microscopy observation.

#### **Fluorescence microscopy and image analysis**

Pneumococcal cells were transferred to microscope slides and observed using an Olympus BX61 optical microscope equipped with a UPFLN 100x O-2PH/1.3 objective and a QImaging Retiga-SRV 1394 cooled charge-coupled device camera. Image acquisition and analysis were performed using the software packages Volocity and open-source Oufiti (PAINTDAKHI et al., 2016), respectively and processed with Adobe Photoshop CS5. Cell population demographs were constructed by Oufiti which integrates the signal values in each cell. The cells are then sorted by their length value and the fluorescence values are plotted as a heat map.

#### **Isolation and chemical analysis of LTA and WTA preparations**

**Extraction and isolation of LTA** : LTA purification was performed basically as described elsewhere,(GISCH et al., 2013) but to optimize yield of LTA, one specific detail has been modified. Pneumococcal cells were resuspended in citrate buffer (50 mM, pH 4.7) and disrupted three times by French press (Constant Cell Disruption System, Serial No. 1020) at 10  $^{\circ}\text{C}$  at a pressure of 20 kPSI. SDS was added to a final concentration of 4% to the combined supernatants. The solution was incubated for 30 min at 100  $^{\circ}\text{C}$  and was stirred afterwards overnight at room temperature. The solution was centrifuged at 30,000 x g for 15 min at 4  $^{\circ}\text{C}$ . The pellet was washed four times with citrate buffer using the centrifugation conditions as above. The combined LTA-containing supernatants and the resulting sediment, containing the crude PG-

WTA complex, were lyophilized separately. The resulting solids were both washed five times with ethanol (centrifugation : 20 min, 20 °C, 10,650 x g) to remove SDS and lyophilized (leading to pellet A containing LTA and pellet B containing the PG-WTA complex). For LTA isolation, pellet A was resuspended in citrate buffer and extracted with an equal volume of butan-1-ol at room temperature under vigorous stirring. The phases were separated by centrifugation at 4,000 x g for 15 min at 4 °C. The aqueous phase (containing LTA) was collected, and the extraction procedure was repeated twice with the organic phase plus interphase. The combined aqueous phases were lyophilized and subsequently dialyzed for 5 days at 4 °C against 50 mM ammonium acetate buffer (pH 4.7; 3.5 kDa cut-off membrane); the buffer was changed every 24 h. The resulting crude LTA was purified further by hydrophobic interaction chromatography (HIC) performed on a HiPrep Octyl-Sepharose column (GE Healthcare; 16 x 100 mm, bed volume 20 ml). The crude LTA material was dissolved in as little starting buffer (15% propan-1-ol in 0.1 M ammonium acetate (pH 4.7)) as possible and centrifuged at 13,000 x g for 5 min at room temperature and the resulting supernatant was lyophilized. The LTA-containing pellet was dissolved in the HIC start buffer at a concentration of 30 mg/mL and purified by HIC using a linear gradient from 15% to 60% propan-1-ol in 0.1 M ammonium acetate (pH 4.7). LTA-containing fractions were identified by a photometric phosphate test. The phosphate-containing fractions were combined, lyophilized and washed with water upon freeze-drying to remove residual buffer.

**Extraction and isolation of WTA :** WTA isolation and extraction was carried out as described elsewhere (BUI et al., 2012), but with minor modifications. Pellet B (containing the crude PG-WTA complex), which arose during LTA isolation, was resuspended at a concentration of 10 mg/mL in 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 20 mM MgSO<sub>4</sub>. DNase A and RNase I were added to final concentrations of 10 and 50 µg/mL, respectively. The suspension was stirred for 2 h at 37 °C. Subsequently, 10 mM CaCl<sub>2</sub> and trypsin (100 µg/mL) were added and the stirring was continued overnight at 37 °C. SDS at a final concentration of 1% was added, and the mixture was incubated for 15 min at 80 °C to inactivate the enzymes. The cell wall was recovered by centrifugation for 45 min at 130,000 x g at 37 °C. The resulting pellet was resuspended in 0.8 mL 8 M LiCl per 1 mL initially used Tris-HCl solution and incubated for 15 min at 37 °C. After another centrifugation using the same conditions as above, the pellet was resuspended in 1 mL 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, pH 7.0) per mL of the Tris-HCl solution used initially and this sample was incubated at 37 °C for 15 min. The pellet was washed twice with water. Finally, the pellet was resuspended in 2 to 4 mL of water

and lyophilized, yielding the purified PG-WTA complex. To remove all amino acids from the PG, the PG-WTA complex was dissolved in 50 mM Tris-HCl (pH 7.0; 10 mg/mL) and treated with the pneumococcal LytA amidase as described elsewhere (BUI et al., 2012). Recombinant His-tagged LytA amidase (1 mg / 10  $\mu$ g LytA; kindly provided by T. P. Kohler, Univ. Greifswald) was added in three aliquots after 0, 24 and 48 h for a total period of incubation of 72 h at 37 °C. Subsequently, the enzyme was inactivated by boiling for 5 min at 100 °C. After centrifugation (25,000 x g, 15 min, 20 °C) the supernatant was collected and lyophilized. The crude LytA-treated PG-WTA complex was further purified by GPC on a Bio-Gel P-30 (45-90  $\mu$ m, BioRad; column size : 1.5 x 120 cm; buffer : 150 mM ammonium acetate (pH 4.7)) column.

#### **6.2.4 Supplements**

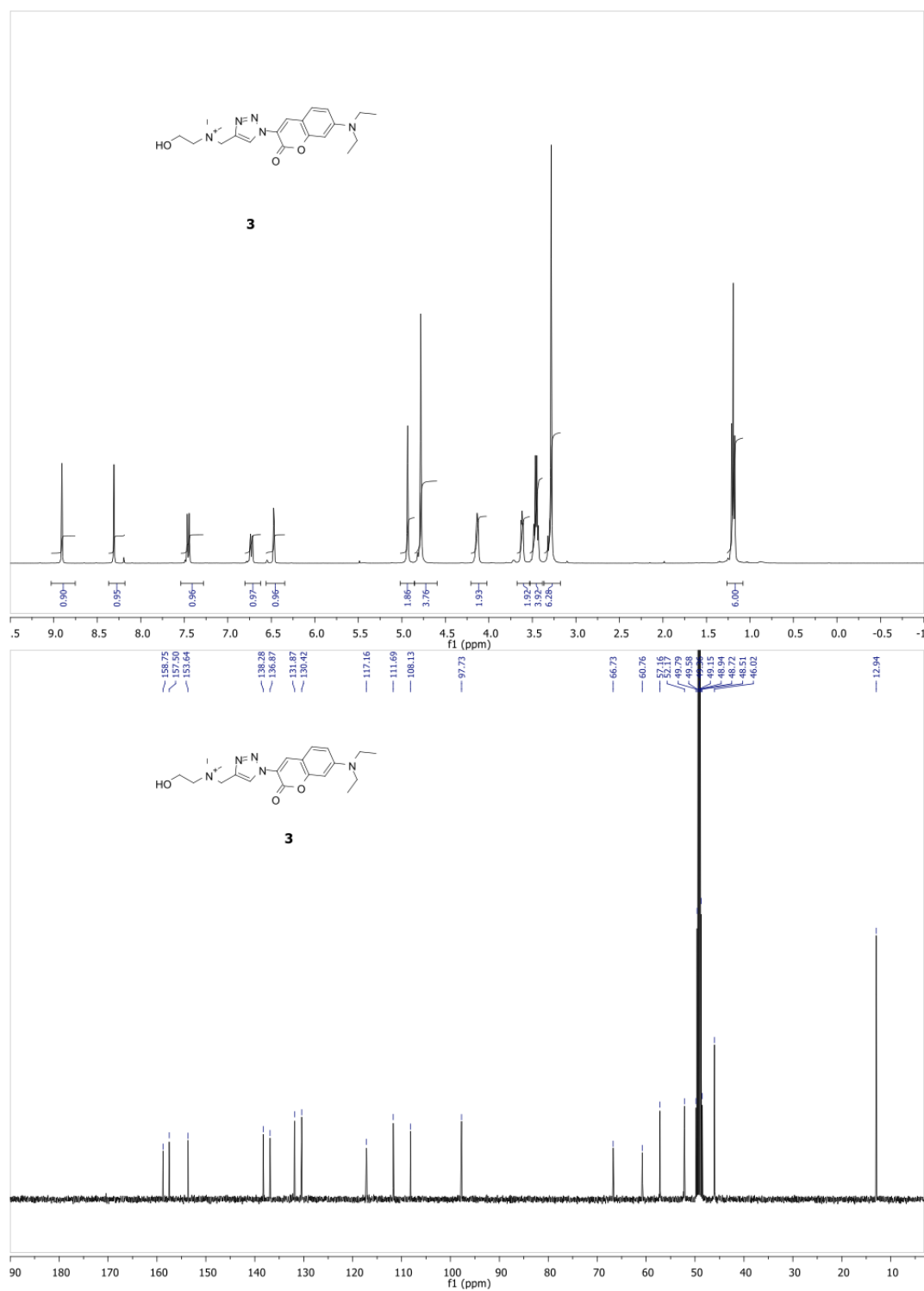
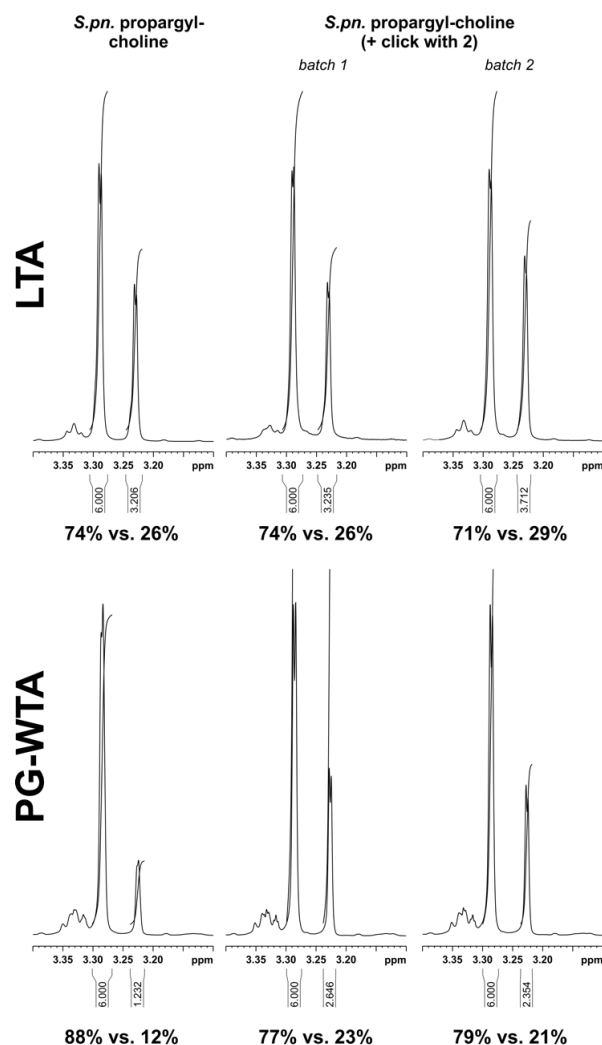
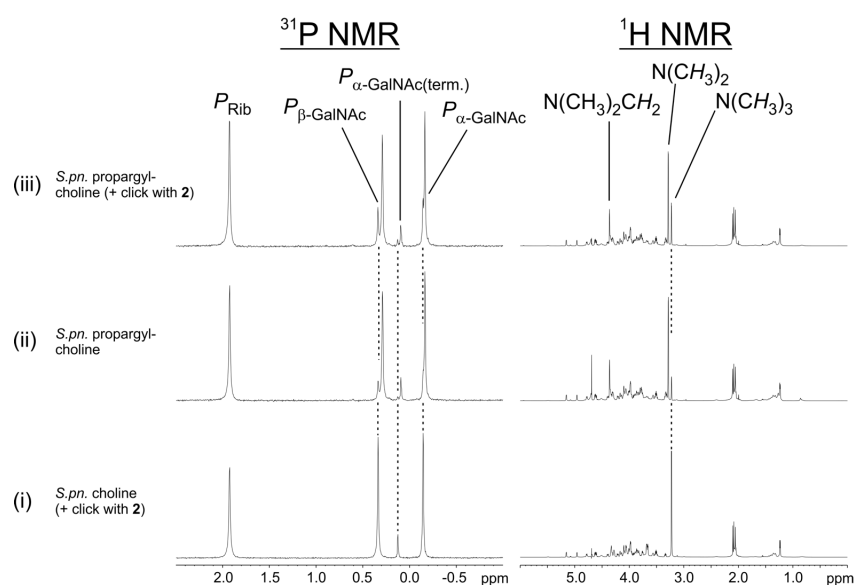


FIGURE 6.9 – <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of **3** in CD<sub>3</sub>OD.

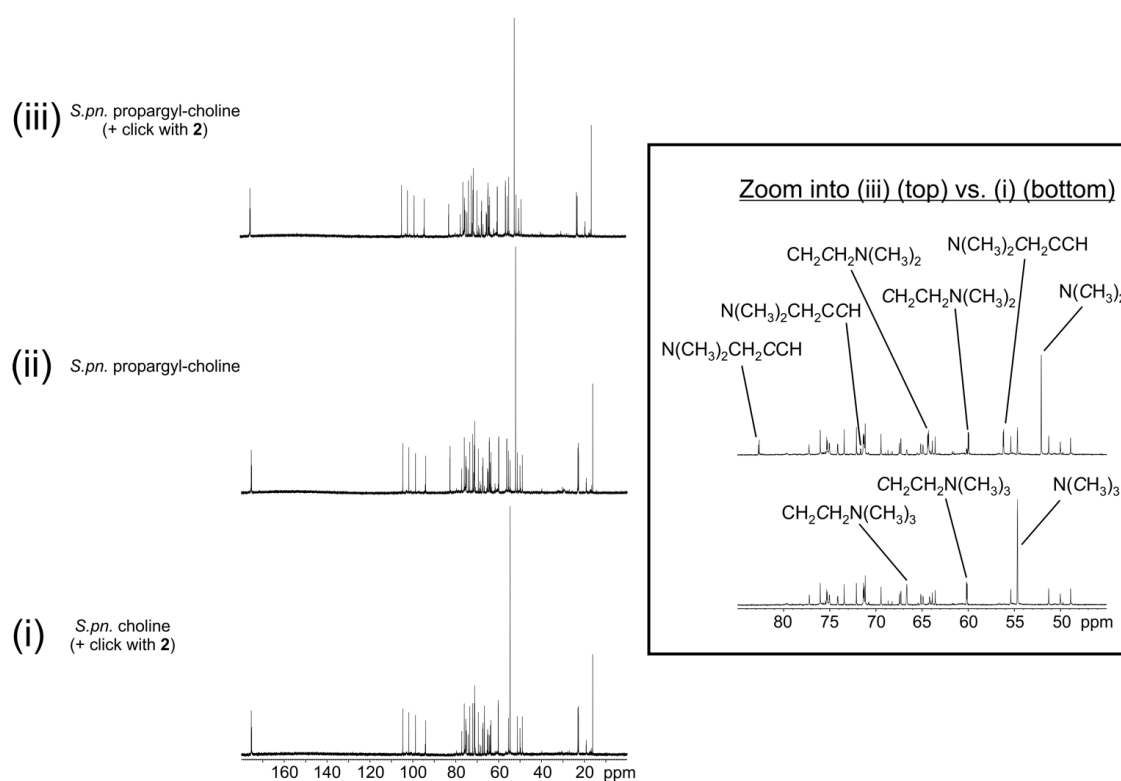




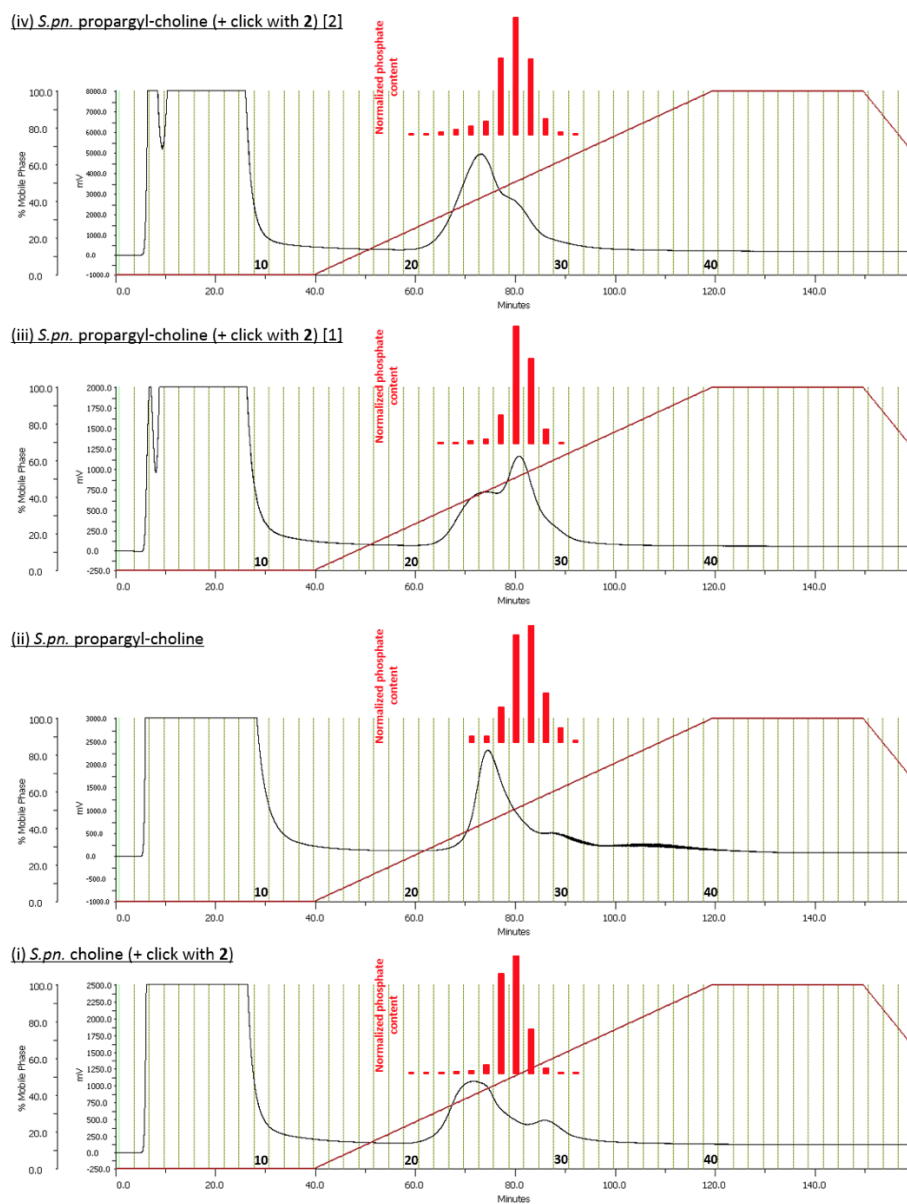
**FIGURE 6.10** – Sections ( $\delta$ H 3.40-3.10) of  $^1\text{H}$  NMR spectra of LTA and PG-WTA preparations, isolated from *S. pneumoniae* grown in the presence of propargyl-choline **1** w/w/o performed bioorthogonal reaction with **2**. For the latter, two independent batches (see also Figure 6.13 page 147, panels (iii) and (iv)) were prepared and analyzed. Both of these preparations led to virtually identical sets of NMR spectra. The signal at  $\delta$ H 3.28 ppm represents the protons of the methyl groups of the  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$  moiety in propargyl-choline **1** and its integral has therefore been set to a value of 6.0 (for 6 protons) for calculation. The signal at  $\delta$ H 3.22 ppm represents the protons of the methyl groups of the  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$  moiety in normal choline (compare Figures 6.4 page 133 and 6.11 page 145) and comprises therefore 9 protons. Rates of incorporated **1** vs. normal choline has been calculated ( $1 : X/9$  with  $X = \text{integral for signal at } \delta\text{H } 3.22 \text{ ppm}$ ), percentage values are given below each spectrum.



**FIGURE 6.11** – Sections of  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\delta\text{P}$  2.5-(-1.0)) and  $^1\text{H}$  NMR (water suppressed;  $\delta\text{H}$  6.0-0.0)) spectra of PG-WTA preparations after LytA treatment, isolated from *S. pneumoniae* grown in the presence of (i) normal choline and subsequent bioorthogonal reaction with **2**, (ii) propargyl-choline **1** and (iii) propargyl-choline **1** and subsequent bioorthogonal reaction with **2**. Incorporation of **1** in WTA is visible by the occurrence of the additional signals in panels (ii) and (iii).

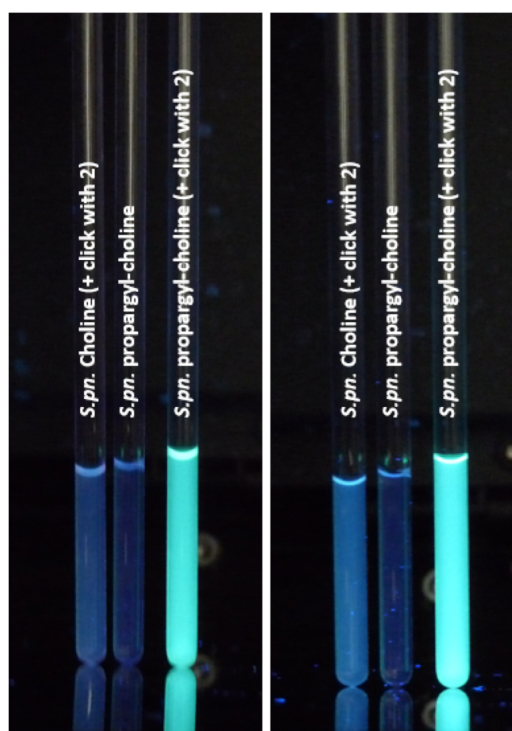


**FIGURE 6.12** – Section of  $^{13}\text{C}$  NMR spectra ( $\delta\text{C}$  180-0) of PG-WTA preparations after LytA treatment, isolated from *S. pneumoniae* grown in the presence of (i) normal choline and subsequent bioorthogonal reaction with **2**, (ii) propargyl-choline **1** and (iii) propargyl-choline **1** and subsequent bioorthogonal reaction with **2**. Incorporation of **1** in WTA is visible by the occurrence of the additional signals in panels (ii) and (iii) (see magnified comparison of spectra (iii) and (i) in the box).

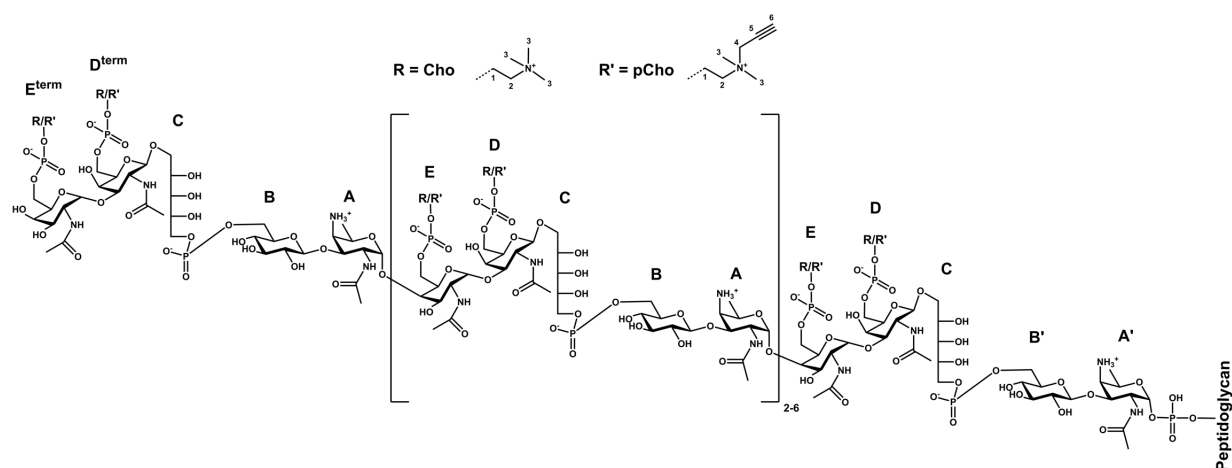


**FIGURE 6.13** – Chromatograms of the hydrophobic interaction chromatography of LTA isolations from *S. pneumoniae* grown in the presence of (i) normal choline (and subsequent bioorthogonal reaction with **2**), (ii) propargyl-choline **1** and (iii, iv) propargyl-choline **1** (and subsequent bioorthogonal reaction with **2**; two independent batches [1] and [2]). The normalized visualization of the phosphate content of selected fractions is included. UV detection was done at = 254 nm, solvent gradient is indicated with the red line. A significant increase in UV signal intensity in the LTA-containing fractions (especially # 26-28) in spectra (iii) and (iv) clearly indicates the covalent attachment of the fluorophore. The UV activity (without phosphate positivity) in the earlier eluting fractions is caused by lipopeptides and potentially other co-eluting molecules.

$\lambda_{\text{exc}} = 302 \text{ nm}$      $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$



**FIGURE 6.14** – Pictures of LTA samples in NMR tubes (dissolved in equal concentrations in D<sub>2</sub>O) from HIC purifications (i), (ii) and (iv) shown in Figure 6.13 page 147 under fluorescence excitation at 302 nm or 365 nm, respectively. The presence of the fluorophore in the sample with incorporated propargyl-choline **1** and performed bioorthogonal reaction with **2** after HIC purification is clearly visible.



**FIGURE 6.15** – Chemical structure of pneumococcal WTA including residue assignment for NMR interpretation (see Table 6.16 page 149).

Residue (assignment)	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6	NAc
→3)-α-AATGalp (1→P (A'))	5.51-5.47* 94.4	4.21-4.16* 48.9	4.37-4.32* 75.1	4.03-3.99* 55.2	4.54-4.49* 64.2	1.38-1.30* 16.6	2.06 23.0 175.3
P→6)-β-D-Glcp-(1→ (B')	4.66-4.62* 104.7	3.35-3.30* 73.4	3.52-3.47* 76.0	3.57-3.51* 69.5	3.58-3.54* 75.0 [7.1]	4.17-4.12* 64.9 [5.2]	
→1)-ribose-(5→P (C)	3.97-3.93* 3.88-3.83* 71.3	4.03-3.98* 71.3	3.78-3.74* 72.1	3.92-3.87* 71.4	4.08-4.03* 4.00-3.95* 67.3 [5.2]		
→3)-β-D-6-O-P- (p)Cho-GalpNAc (1→ (D)	4.61 [8.7] 101.9	4.13-4.06* 51.3	3.88-3.83* 75.3	4.19-4.15* 63.9	3.85-3.80* 74.1 [7.8]	4.09-4.03* 65.2 [4.6]	2.08 23.1 175.4
→4)-α-D-6-O-P- (p)Cho-GalpNAc (1→ (E)	5.16 [3.1] 94.0	4.34-4.30* 50.0	3.94-3.90* 67.5	4.12-4.08* 77.3	4.02-3.98* 71.2	4.06-3.96* 64.4-64.2*	2.05 22.7 175.3
→3)-α-AATGalp-(1→ (A)	4.96 [2.8] 98.8	4.23-4.18* 48.9	4.42-4.37* 75.3	4.00-3.96* 55.4	4.80-4.75* 63.6	1.24 [6.4] 16.1	2.10 22.8 175.1
P→6)-β-D-Glcp-(1→ (B)	4.63 [8.2] 104.7	3.37-3.31* 73.4	3.52-3.47* 76.0	3.55-3.49* 69.5	3.59-3.53* 75.0 [7.1]	4.12-4.06* 64.9 [5.2]	
→3)-β-D-6-O-P- (p)Cho-GalpNAc (1→ (D <sup>term</sup> )	4.63-4.59* <sup>§</sup> 101.9	4.13-4.06* 51.3	3.85-3.81* 75.5	4.15-4.13* 64.0	3.85-3.80* 74.1 [7.8]	4.09-4.03* 65.2 [4.6]	2.08 23.1 175.4
→4)-α-D-6-O-P- (p)Cho-GalpNAc (E <sup>term</sup> )	5.08 [3.8] <sup>§§</sup> 94.2	4.23-4.20* 50.0	3.82-3.78* 68.2	4.05-4.02* 68.7	4.00-3.96* 70.8 [8.4]	4.08-4.04* 4.03-3.98* 65.6-65.5*	2.04 22.7 175.3
Cho-P-(6-O→ @ D, D <sup>term</sup> , E <sup>term</sup> )	4.35-4.31* 60.2 [5.2]	3.70-3.66* 66.7-66.5*	3.22 54.7				
Cho-P-(6-O→ @ E)	4.30-4.26* 60.1 [5.2]	3.67-3.64* 66.7-66.5*	3.22 54.7				
pCho-P-(6-O→ @ D, D <sup>term</sup> , E <sup>term</sup> )	4.37-4.32* 60.0 [5.2]	3.82-3.78* 64.4 [8.0]					
pCho-P-(6-O→ @ E)	4.32-4.27* 59.9 [5.1]	3.79-3.75* 64.4-64.2*		3.28 52.1	4.38-4.34* 56.2/56.1	- 82.7/82.6	3.34-3.30* 71.7/71.6
<sup>31</sup> P	P-5C/6B/B' 1.93; P-6D/D(term)/CH <sub>2</sub> OCho 0.34; P-6D/D(term)/CH <sub>2</sub> O <sup>p</sup> Cho 0.29; P-6E(term)/CH <sub>2</sub> OCho 0.12; P-6E(term)/CH <sub>2</sub> O <sup>p</sup> Cho 0.09; P-6F/CH <sub>2</sub> OCho -0.15; P-6F/CH <sub>2</sub> O <sup>p</sup> Cho -0.16; P-1A'/6MurNAc -1.00(-1.40)**.						

**FIGURE 6.16** – <sup>1</sup>H (700.4 MHz), <sup>13</sup>C NMR (176.1 MHz), and <sup>31</sup>P NMR (283.5 MHz) chemical shift data ( $\delta$ , ppm) [ $J$ , Hz] of WTA bound to the PG sugar chain after LytA-treatment from *S. pneumoniae* grown in the presence of propargyl-choline **1** (corresponding <sup>31</sup>P and <sup>1</sup>H NMR spectra are shown in Figure 6.11 page 145 panel (ii), the <sup>13</sup>C NMR in Figure 6.12 page 146 panel (ii); chemical structure and residue assignment is depicted in Figure 6.15 page 148). \*non-resolved multiplet, \*\*multiple signals; without PCho : §4.58 [8.7], 101.9; §§5.08-5.06\*, 94.1.



# 7

Les polysaccharides de la paroi, TA et PG  
sont co-synthétisés au site de division

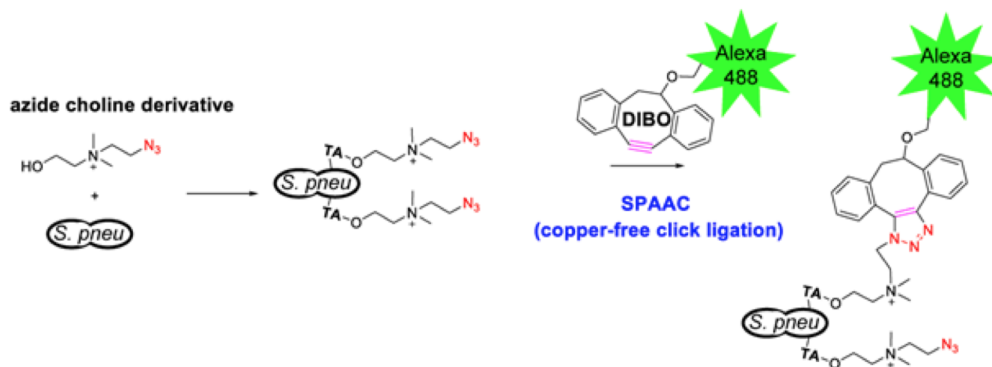
## Sommaire

---

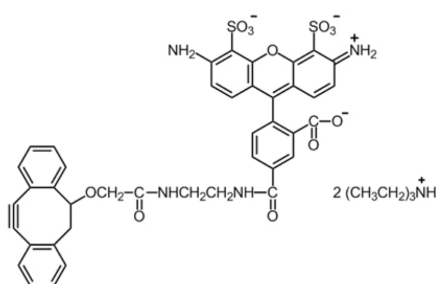
7.1	Contexte et objectifs de l'étude . . . . .	152
7.2	Perspectives . . . . .	155

---





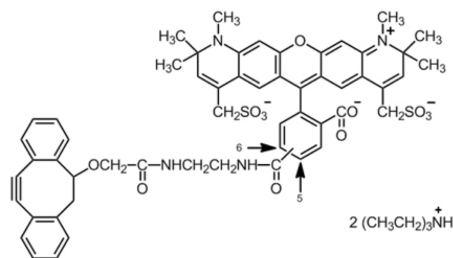
**FIGURE 7.1** – Schéma du marquage des TA de *S. pneumoniae* par la réaction de chimie click sans cuivre en utilisant une choline modifiée possédant un groupement azoturé et la molécule fluorescente Click-IT Alexa Fluor 488 nm DIBO Alkyne possédant le groupement alcyne capable de se fixer de manière covalente à l'azoture de la choline modifiée.



**FIGURE 7.2** – Schéma de la molécule Click-IT Alexa Fluor 488 nm DIBO Alkyne  
Source : <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10405>

## 7.1 Contexte et objectifs de l'étude

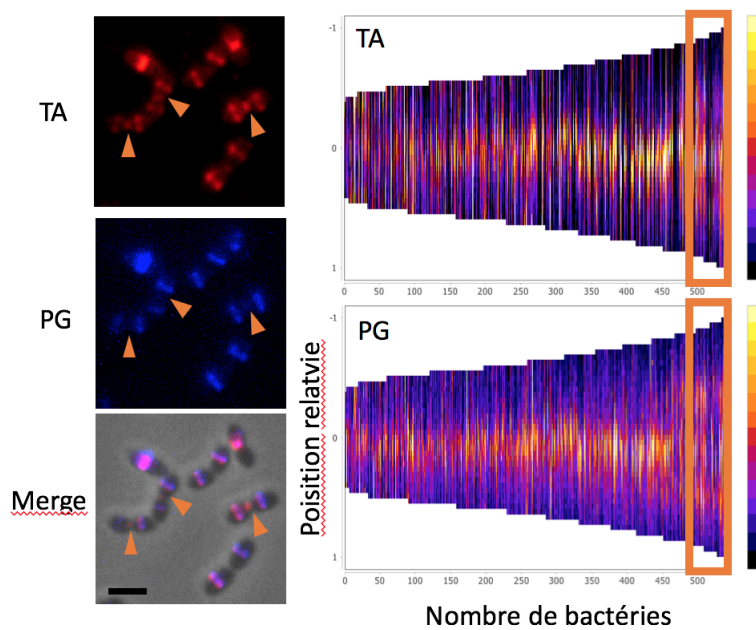
La méthode de marquage des acides téichoïques décrite précédemment nécessitait l'utilisation de cuivre afin de lier de manière covalente les groupements réactifs présents sur la choline modifiée et le fluorophore. Cependant, son utilisation s'est avérée toxique pour les bactéries, empêchant toute possibilité d'études *in vivo* prolongées en vidéomicroscopie ou "pulse chase". De ce fait, une autre molécule de chimie click non dépendante du cuivre a été utilisée par la suite pour le marquage des TA (Figure 7.1 page 152). Une choline modifiée (nommée choline 1413) avec un groupement azoturé a été synthétisée. La molécule de marquage utilisée se nomme Click-IT Alexa Fluor DIBO Alkyne (Thermofischer). Elle est composée d'un groupement alcyne qui réagit avec l'azoture présent sur la choline modifiée, et d'un Alexa Fluor dont plusieurs longueurs d'onde sont disponibles. Au laboratoire, nous avons validé l'utilisation des molécules couplées aux Alexa Fluor 488nm (émission dans le vert, Figure 7.2 page 152) et 594 nm (émission dans le rouge lointain, Figure 7.3 page 153).



**FIGURE 7.3 – Schéma de la molécule Click-IT Alexa Fluor 594 nm DIBO Alkyne**  
 Source : <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10407>

Comme décrit dans la partie matériel et méthode de la deuxième publication (chapitre 6 page 125), les cellules sont incubées avec la choline modifiée (ici choline 1413) à 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  puis lavée et la molécule Click-IT Alexa Fluor DIBO Alkyne est ajoutée à 250  $\mu\text{M}$ . Pour cette technique, il s'avère que la co-incubation choline 1413 et Click-IT Alexa Fluor DIBO Alkyne fonctionne aussi très bien (cf figure 7.4 page 154). Afin de localiser les sites de synthèse des TA et du PG sur des mêmes cellules, les bactéries ayant été cultivées en présence de choline normale sont lavées puis incubées pendant 5 minutes avec du milieu contenant 2 mM de HADA (acides aminé fluorescent marquant le PG néosynthétisé), 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de choline modifiée et 250  $\mu\text{M}$  de Click-IT Alexa Fluor 594 nm DIBO Alkyne. Après lavages (trois lavages de 3 minutes à 5000 g) et resuspension en Cmedium, les cellules sont observées par microscopie conventionnelle à fluorescence (le protocole utilisé est décrit en détail dans le matériel et méthode de la publication suivante chapitre 8 157).

Les résultats montrent le même profil de localisation de la néo-synthèse des TA qu'avec la méthode de chimie click au cuivre. On observe que les synthèses des TA et du PG colocalisent au site de division au cours du cycle cellulaire (Figure 7.4 page 154). Cependant, au niveau des cellules se trouvant au dernier stade de division, c'est-à-dire avant la séparation des cellules filles, la synthèse des TA est encore active à l'ancien site de division (flèches et encadrés oranges, figure 7.4 page 154) alors que celle du PG n'est effectuée qu'au futur site de division des cellules filles. Ce résultat suggère qu'il y aurait un léger décalage, en fin de cycle, entre la néo-synthèse des TA et celle du PG. Afin de confirmer ces résultats la colocalisation des TA avec d'autres marqueurs du site de synthèse du PG tels que la vancomycine fluorescente et le lipide II sont en cours.



**FIGURE 7.4 – Co-localisation des sites de synthèse des TA et du PG.** Pulse de 5 minutes de marquage des TA par chimie click (TA) et du PG avec l'acide aminé fluorescent (HADA) (PG), la superposition des deux images de fluorescence et celle capturée en contraste de phase est également présentée (Merge). La localisation du signal fluorescent a été analysée dans environ 600 bactéries avec MicrobeJ et représenté en démographe. Les synthèses des TA et du PG colocalisent au site de division mais la synthèse des TA semble continuer après l'arrêt de la synthèse de PG au site parental de division en fin de cycle (flèches et encadrés oranges). Barre d'échelle : 2  $\mu\text{m}$ .

## 7.2 Perspectives

L'utilisation de cette méthode fait l'objet d'une publication du laboratoire en cours de rédaction et non présentée dans ce manuscrit dans laquelle la localisation et la dynamique de biosynthèse des TA sont étudiés plus en détails dans des souches sauvages et mutantes pour des protéines impliquées dans la synthèse de la paroi et la division.

Cette méthode ouvre aussi le champ à l'étude du rôle des TA dans la localisation des protéines qu'ils supportent, les CBPs. La publication suivante utilise cette technique de chimie click dans le contexte de l'étude du rôle des TA dans la régulation de l'activité et la localisation de la CBP et autolysine majeure du pneumocoque, LytA.



# 8

## Nascent teichoic acids direct the cell surface localization and the activity of the major autolysin LytA

### Sommaire

---

<b>8.1</b>	<b>Contexte . . . . .</b>	<b>158</b>
<b>8.2</b>	<b>Publication . . . . .</b>	<b>159</b>
8.2.1	Résumé . . . . .	160
8.2.2	Introduction . . . . .	162
8.2.3	Methods . . . . .	164
8.2.4	Results . . . . .	173
8.2.5	Discussion . . . . .	185

---

## 8.1 Contexte

Les TA composent la moitié de la paroi des bactéries à Gram positif, pourtant leur rôle reste encore peu compris. Chez plusieurs bactéries, les études montrent que les TA participent aux mécanismes de la morphogénèse bactérienne par le contrôle du remodelage du peptidoglycane en dirigeant la localisation subcellulaire et en régulant l'activité d'enzymes clés de l'hydrolyse du PG (cf chapitre 3.3 page 77).

Chez *S. pneumoniae*, les TA sont le support des CBPs, une famille de protéines impliquées dans de nombreux mécanismes physiologiques de la bactérie et d'interaction avec l'hôte (cf 2.1.4 page 36). Parmi ces protéines, LytA est l'autolysine majeure du pneumocoque, elle est responsable de l'autolyse en phase stationnaire, intervient dans la lyse fratricide et la lyse induite par certains antibiotiques, et joue un rôle dans la virulence (cf 2.1.4.1 page 36). LytA est majoritairement présente dans le cytoplasme durant la phase exponentielle de croissance, elle est relarguée à la surface bactérienne en phase stationnaire, par un mécanisme encore inconnu, et déclenche l'autolyse des bactéries. Les mécanismes de régulation de son activité et de sa localisation ne sont pas entièrement compris. LytA est composée d'un domaine amidase qui hydrolyse le PG et d'un CBD se liant au résidu PCho des TA. Le rôle de chacun de ces domaines dans la localisation de LytA ont été étudiés et montrent que sa localisation à la surface bactérienne est uniquement dépendante du CBD. Cette étude démontre aussi le rôle des TA dans la morphogénèse et la division du pneumocoque. De plus, grâce à l'utilisation de la méthode de marquage des acides téichoïques décrite chapitre 7 page 151, un lien de régulation directe entre les TA et le remodelage du PG a été révélé par l'action de l'autolysine LytA dont la localisation et l'activité d'hydrolyse du PG sont régulées via les TA.

Les résultats montrent que LytA se fixe uniquement sur les TA néosynthétisés au site septal. Par la suite, les déterminants moléculaires responsables de cette localisation spécifiques devront être étudiés, à la fois au niveau du CBD de LytA et des propriétés spécifiques des TA au site septal.

## 8.2 Publication

### **Nascent teichoic acids direct the cell surface localization and the activity of the major autolysin LytA.**

Bonnet J<sup>1</sup>, Durmort C<sup>1</sup>, Mortier-Barrière I<sup>2</sup>, Jacq M<sup>1#</sup>, Straume D<sup>3</sup>, Berg KH<sup>3</sup>, Wei H<sup>3</sup>, Havårstein L<sup>3</sup>, Vernet T<sup>1</sup>, Di Guilmi AM<sup>1\*</sup>

Manuscrit non publié

<sup>1</sup> Institut de Biologie Structurale (IBS), Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, 38044 Grenoble, France.

<sup>2</sup> Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, Centre de Biologie intégrative (CBI), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de Toulouse, UPS, F-31000 UMR Toulouse, France.

<sup>3</sup> Departments of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences, P.O. Box 5003, NO-1432 Aas, Norway

# Present address : Department of Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana, USA

\* Present address : CEA, 18 route du panorama, 92265 Fontenay-aux-roses cedex, France.

Corresponding author : Anne Marie Di Guilmi. Tel : +33 1 46 54 98 57. E-mail : anne-marie.di-guilmi@cea.fr



### 8.2.1 Résumé

La paroi bactérienne est composée du peptidoglycane (PG) qui maintient la forme cellulaire et supporte les mécanismes cellulaires de croissance et division. La paroi des bactéries à Gram positif est aussi composée des acides téichoïques (TA). Un lien fonctionnel entre les TA et les hydrolases du PG durant la division a été mis en évidence dans les bactéries modèles *B. subtilis* et *S. aureus*. Dans cette étude, nous avons étudié comment les TA contribuent à la fonction hydrolytique du PG. Nous avons adressé ces questions dans le contexte de la bactérie à Gram positif *Streptococcus pneumoniae*, les TA de cette bactérie étant décorés par des résidus phosphorycholines. Les molécules de choline servent d'ancres aux Choline-Binding Proteins (CBPs), parmi lesquelles différentes hydrolases du PG existent, dont l'autolysine majeure LytA. Cette fixation est non-covalente et réversible, une propriété qui permet une manipulation facile de ce système. Dans cette étude, nous avons montré que durant la phase stationnaire, LytA est relarguée indépendamment de son activité amidase alors que la lyse cellulaire induite par LytA le domaine amidase et le choline binding domain (CBD). La localisation de LytA a été étudiée *in vivo* et montre qu'elle varie en fonction de la phase de croissance. Nous avons démontré que les TA agissent sur l'activité de LytA puisque qu'un niveau faible de TA à la surface bactérienne déclenche la sensibilité à LytA en phase exponentielle. Nous avons précédemment développé une méthode de marquage des TA naissants sur cellules vivantes révélant ainsi que la synthèse des TA a lieu au milieu de la cellule (en préparation). Nous montrons ici que les TA néo-synthétisés au site septal sont les récepteurs spécifiques de LytA, contrôlant de cette manière la localisation de LytA au site approprié à la surface cellulaire.

### Abstract

The bacterial cell wall is composed by the peptidoglycan (PG) that maintains the cell shape and sustains the basic cellular processes of growth and division. The cell wall of Gram-positive bacteria also carries teichoic acids (TA). A functional link between TA and PG hydrolases during cell division has been highlighted in bacterial models like *B. subtilis* and *S. aureus*. In this work, we investigated how TA contribute to the PG hydrolytic function. We addressed these questions in the context of the Gram-positive *Streptococcus pneumoniae* bacterium since pneumococcal TA are decorated by phosphorylcholine residues. The choline molecules serve as anchors for the Choline-Binding Proteins, among which are the PG hydrolases, like the major autolysin LytA. Their binding is non covalent and reversible, a property that allows

easy manipulation of the system. In this work, we show that during the stationary phase, LytA is released independently from the amidase activity while the cell lysis induced by LytA requires both the amidase and CBD functions. The localization of LytA was investigated *in vivo* and showed to vary according to the growth phases. Importantly, we demonstrate that TA act on the enzymatic activity of LytA since a low level of TA present at the cell surface triggers LytA sensitivity in growing pneumococcal cells. We previously developed a method to label nascent TA in live cells revealing that TA synthesis occurs at mid-cell (in preparation). Here we demonstrate that nascent TA synthesized at the septal site are the specific receptors of LytA, tuning in this way the positioning of LytA at the appropriate place at the cell surface.

## 8.2.2 Introduction

The bacterial cell wall maintains the cell shape and sustains the basic cellular processes of growth and division. It is also required to resist turgor pressure and provides an interface between the cell and its environment. Because the cell wall is essential for viability and is composed by molecules not present in host cells, the biosynthetic enzymes have been exploited as successful targets for antibiotic development. Bacteria are surrounded by peptidoglycan (PG), a matrix of linear glycan chains of N-acetylmuramic acid (MurNAc) and N-acetylglucosamine (GluNAc) residues, which are cross-linked via peptides strands composed by L- and D-amino acids. Assembly of the PG network requires synthetic and hydrolytic enzymes. Penicillin-Binding Proteins (PBPs) and SEDS proteins (Shape, Elongation, Division and Sporulation) polymerize the glycan chains (glycosyltransferase activity) while only PBPs cross-link the peptide strands (the transpeptidation activity that is inhibited by  $\beta$ -lactam antibiotics) (for reviews on PBPs, see : SAUVAGE et al., 2008 ; SAUVAGE et TERRAK, 2016 ; EGAN et al., 2015 ; MEESKE et al., 2016 ; EMAMI et al., 2017). Endogenous peptidoglycan hydrolases are divided into different classes according to their substrate specificity and cleave the PG polymer in order to insert new material and to allow daughter cells separation and peptidoglycan maturation (for reviews see : VOLLMER et al., 2008 ; SMITH, BLACKMAN et FOSTER, 2000). The cell wall of Gram-positive bacteria also carries teichoic acids (TA). These glycopolymers represent about half of the cell wall's dry weight and are either attached to the PG (wall teichoic acids, WTA) or anchored to the cytoplasmic membrane (lipoteichoic acid, LTA) (BROWN, SANTA MARIA et WALKER, 2013 ; PERCY et GRÜNDLING, 2014). TA are essentials and display numerous functions, in particular in cell morphology and cell division. In many bacterial species, like Lactobacilli, Bacilli and Staphylococci, LTA and WTA display different chemical structures and their biosynthesis depend on distinct biochemical pathways. WTA synthesis is controlled by tag and tar genes (BROWN, SANTA MARIA et WALKER, 2013 ; PERCY et GRÜNDLING, 2014) and a key enzyme in the LTA biosynthesis pathway is LtaS (GRÜNDLING et SCHNEEWIND, 2007).

A functional link between TA and PG hydrolases during cell division has been highlighted in *B. subtilis* and *S. aureus* (YAMAMOTO et al., 2008 ; KIRIYAMA et al., 2014 ; SCHLAG et al., 2010). Several issues yet to address are whether TA contribute to the PG hydrolytic function, directly or indirectly, at the enzymatic activity and/or the subcellular localization levels. We addressed these questions in the context of the Gram-positive *Streptococcus pneumoniae* bacterium.

*S. pneumoniae* is an ovoid coccus, a morphological group that includes several hu-

man pathogens, like enterococci and streptococci. The morphogenetic process of this ovococcal bacterium is distinct from that of cocci like *S. aureus* and rod-shape organisms exemplified by *B. subtilis* since it results from two modes of PG insertion, one allowing division by synthesizing a septum (septal or cross-wall synthesis), the other allowing elongation by synthesizing peripheral cell wall (peripheral synthesis).

Pneumococcal TA exhibit specific and convenient features relevant to this study. First, pneumococcal WTA and LTA chains have identical repeated unit structures and length distribution, indicating that both polymers are produced by the same biosynthetic pathway (for a review, see DENAPAITE et al., 2012). The second striking feature is the decoration of TA by phosphorylcholine. Choline is not rare in bacteria but *S. pneumoniae* is the only known species whose growth exclusively depends on exogenous choline which is exclusively integrated into the TA. The choline serves as an anchor for the class of Choline-Binding Proteins (CBPs), among which are the PG hydrolases (FROLET et al., 2010). Their binding is non covalent and reversible, a property that allows easy manipulation of the system.

Amongst the choline binding proteins LytA is the major pneumococcal autolysin responsible for the autolysis that occurs several hours after entering the stationary phase (TOMASZ, 1968 ; HOWARD et GOODER, 1974). LytA is a N-acetylmuramidase that cleaves the bond between the glycan strands of the peptidoglycan and the peptidic bond. LytA is only active against stationary-phase cells (TOMASZ et WAKS, 1975 ; MELLROTH et al., 2012), suggesting that the arrest of the division process leads to peptidoglycan sensitivity to LytA. We recently showed that PG O-acetylation (CRISOSTOMO et al., 2006) protects growing pneumococcal cells from lysis induced by LytA (in revision). In addition to the amidase catalytic domain, LytA contains a Choline-Binding Domain (CBD) that mediates the binding to TA via the choline residues. This PG hydrolase is thus a relevant bivalent protein to exemplify the relationship between TA and PG hydrolysis activity.

An alternative way to investigate how TA might guide the positioning of PG hydrolases would be to analyze whether TA display a particular pattern at the cell surface matching the pattern of tethered proteins. Although the chemical composition and biosynthesis of TA are partially described and their importance in cell physiology ascertained, the variation of their synthesis and three-dimensional organization during the cell cycle is still very poorly understood. The scarcity of data mainly originates from the lack of appropriate tools. Indeed, labeling of TA has only been performed using concanavalin A, a lectin that binds glucose or mannose but

that leads to cell aggregation, high degree of non-specific labeling and poor efficient labeling (SCHLAG et al., 2010). Interestingly, coupling atomic force microscopy with fluorescent lectin probe revealed that WTA in *Lactobacillus plantarum* are distributed across the cell surface but absent from the cell poles (ANDRE et al., 2011). We recently developed a method to label pneumococcal TA by exploiting the choline-growth dependency of *S. pneumoniae* (submitted). Based on the metabolism and incorporation into TA of chemically-modified choline molecules and their fluorescent labeling by bioorthogonal reaction related to the click chemistry approach, we could localize and follow by time-lapse in live cells the dynamics of the TA biosynthesis (in preparation). Here, this method has been used to co-localize TA and LytA.

In this work, we show that during the stationary phase, LytA is released independently from the amidase activity while the cell lysis induced by LytA requires both the amidase and CBD functions. We also demonstrate that TA are involved in the regulation of the LytA activity : firstly, the level of TA present at the cell surface influences the sensitivity of growing pneumococcal cells to LytA and secondly, nascent TA synthesized at the septal site are the specific receptors of LytA, tuning in this way the positioning of LytA at the cell surface.

### 8.2.3 Methods

**Plasmid construction and site-directed mutagenesis.** Plasmids, and oligonucleotide primers used are listed in Table 1. The synthetic gene encoding the superfolder variant of GFP (sfGFPop) was optimized for expression in *S. pneumoniae* and ordered from GeneArt (Invitrogen). For the construction of pJB3 (Pzn-lytA-sfGFPop) plasmid, the *lytA* gene was amplified by PCR with pJB3For and pJB3Rev primers, digested by BssHII and BsiWI and inserted into pADG0 between BssHII and BsiWI [bgaA : :PczcD-lytA-sfGFPop] to generate pJB3. pJB31 (Pzn-lytAE87Q-sfGFPop) plasmid was constructed by PCR-based site-directed mutagenesis using ForoMJ62 and RevoMJ63 primers to introduce the E87Q mutation in the *lytA* gene on the pJB3 plasmid. pJB33 (Pzn-lytAAMI-sfGFPop) plasmid was constructed by PCR-based site-directed mutagenesis using pJB33For and pJB33Rev primers to delete the choline binding domain sequence in the *lytA* gene on the pJB3 plasmid. pJB34 (Pzn-lytACBD-sfGFPop) plasmid was constructed by PCR-based site-directed mutagenesis using pJB34For and pJB34Rev primers to delete the amidase sequence in the *lytA* gene on the pJB3 plasmid. For the construction of the pADG12 plasmid, the gene encoding the superfolder variant of GFP (sfGFPop) was optimized for the expression in *S. pneumoniae* (GeneArt, Invitrogen) and cloned in a His tagged protein expres-

sion vector. For the construction of the pADG14 plasmid (8xHis-sfGFPop-LytA), the *lytA* gene was amplified by PCR with pADG14For and pADG14Rev primers, digested by HindIII and XhoI and inserted into pADG12 between HindIII and XhoI to generate pJB14. pADG141 plasmid (8xHis-sfGFPop-LytAAMI) was constructed by PCR-based site-directed mutagenesis using pJB141For and pJB141Rev primers to delete the choline binding domain sequence in the *lytA* gene on the pADG14 plasmid. pADG142 plasmid (8xHis-sfGFPop-LytACBD) was constructed by PCR-based site-directed mutagenesis using pJB142For and pJB142Rev primers to delete the choline binding domain sequence in the *lytA* gene on the pADG14 plasmid. DNA sequencing was performed by Beckman Coulter Genomics, Genewiz.

Strain SPH143 was derived from strain SPH131 (BERG et al., 2011) by replacing its Janus cassette (SUNG et al., 2001) with the genes *tarI* and *tarJ* (*spr1149* and *spr1148*). The *tarIJ* fragment was amplified by PCR from *S. pneumoniae* RH1 using the primers *khb90* and *khb91*. Fragments corresponding to the 950 bp region upstream and 800 bp region downstream of the Janus cassette in SPH131 were amplified using the primer pairs *khb31/khb36* and *khb33/khb34*, respectively. These fragments were subsequently fused to the 5' and 3' ends of the *tarIJ* fragment using the primers *khb31* and *khb34* and overlap extension PCR as described by (HIGUCHI, KRUMMEL et SAIKI, 1988). The fusion product was used to transform SPH131, resulting in a strain that expresses *tarIJ* ectopically from PcomX when ComS\* is added to the growth medium.

To construct the strain SPH144, the native *tarIJ* genes of strain SPH143 were replaced by the Janus cassette. The Janus cassette was amplified from RH426 using the primers *Kan484F* and *khb94*. Next, the primers *khb92* and *khb93* were used to amplify a 800 bp DNA fragment corresponding to the region flanking the 5' end of *tarI*, whereas the primers *khb95* and *khb96* were used to amplify the 800 bp region flanking the 3' end of *tarJ*. The two fragments were then fused to the 5' and 3' ends of the Janus cassette respectively, using the primers *khb92* and *khb96*. Primer *khb94* contains an overhang that introduced the synthetic constitutive promoter P1 [33] downstream of the Janus cassette. This ensured that the essential *licABC* genes, which are situated on the same transcriptional unit as *tarI* and *tarJ*, were still expressed when the Janus cassette was inserted in place of the *tarIJ* genes. During transformation and subsequent selection of transformants, ComS\* (2  $\mu$ M) was added to the growth medium and agar plates to drive ectopic expression of *tarIJ*. Strain SPH145 was constructed by deleting the Janus cassette in SPH144. Fragments corresponding to the 800 bp upstream and downstream regions of the Janus cassette in strain SPH144 were amplified using the primer pairs *khb92/khb97*

and khb98/khb96. The fragments were joined using the primers khb92 and khb96, and the resulting fusion product was used to transform strain SPH144. This gave rise to strain SPH145, in which the regions flanking the native tarIJ genes are directly linked and normal expression of the licABC genes from their own promoter is re-established. Strain SPH146 was derived from SPH145 by replacing the *lytA* gene (spr1754) of SPH145 with a spectinomycin resistant marker (aad9). The *lytA* : :SpcR fragment used to transform SPH145 was amplified from the genome of RH431 using the primers LytAF and LytAR.

For the gene depletion studies of tarIJ we used the ComRS system described previously (BERG et al., 2011). In brief, strain SPH146 (tarIJ-depletion) was grown in the presence of 2  $\mu$ M ComS\*. The cells were collected by centrifugation and washed once in fresh C medium to remove excess ComS\*. Then the cells were resuspended in fresh C medium without ComS\* to an OD492 of 0.05 before they were twofold diluted in eppendorf tubes containing C medium. The dilution series were then transferred to a 96-well NBS clear-bottom plate (Corning) containing 2  $\mu$ M or 0  $\mu$ M ComS\* and incubated in a FluoStar Optima plate-reader (BMG Labtech) at 37°C. The OD492 was measured automatically every 10 min. In the experiments where expression of tarIJ was fine-tuned in a dose-dependent manner, cultures of SPH146 were diluted to OD492  $\tilde{0}.05$  in C medium with 2  $\mu$ M ComS\* and grown for 1 h. Then the cells were harvested, washed, and transferred to C medium containing a 1.25-fold dilution series of ComS\* (0.125, 0.1, 0.08, 0.064, 0.0512, 0.041, 0.033 0.026 and 0.021  $\mu$ M). Then the cells were transferred to a NBS clear-bottom plate for OD492-measurments. When LytA-sensitivity was examined, LytA (5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) was added to selected wells in the plate at the start of the experiment, or in the exponential growth phase at OD492  $\tilde{0}.25$ .

**Bacterial strains.** WT *lytA*-sfGFP, *lytA*-*lytA*-sfGFP, *lytA*-*lytAE87Q*-sfGFP, *lytA*-*lytAAMI*-sfGFP and *lytA*-*lytACBD*-sfGFP strains were obtained by transformation with pJB3 (*lytA*-sfGFP), pJB31 (*lytAE87Q*-sfGFP), pJB33 (-*lytAAMI*-sfGFP) or pJB34 (*lytACBD*-sfGFP) plasmid (TetR), respectively in the appropriate genetic background. The strains, plasmids, and oligonucleotide primers used are listed in Table 1. Allelic replacements were performed using the Janus method, a two-step procedure based on a bicistronic *kan-rpsL* cassette called Janus (SUNG et al., 2001). This method avoids polar effects and allows expression of the fusion proteins at physiological levels.

**Growth conditions, media, and transformation.** Liquid cultures of *S. pneu-*

*moniae* strains were grown at 37°C/5%CO<sub>2</sub> in Cmedium (Cmed) supplemented with 0.5% yeast extract (LACKS et HOTCHKISS, 1960) (CY), Chemically Defined Medium containing 5 or 10 µg/ml choline (CDM-Cho-5, CDM-Cho-10) or in Todd Hewitt medium (TH; BD Sciences). For strains harboring a zinc-inducible plasmid, CY was supplemented with 0.15 mM ZnCl<sub>2</sub> to induce protein expression. For transformation, about 250 ng of DNA was added to cells treated with synthetic competence stimulating peptide 1 in TH medium at pH 8.0 supplemented with 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Cells were grown for 2 h at 37°C/5%CO<sub>2</sub>, and transformants were selected on Columbia (BD Sciences) blood (4%) agar plates containing the appropriate antibiotics (tetracyclin 250 µg/ml).

Continuous growth was followed by inoculating 2.5 ml of CY, CDM-Cho-5 or CDM-Cho-10 in 24-wells plates, which were sealed and incubated at 37°C in a FLUOstar plate reader (BMG Labtech) equipped with a 595-nm filter. The OD<sub>595</sub> was recorded every 10 to 20 min after shaking. Each point was done in triplicate and experiments repeated three independent times. LytA sensitivity was determined by adding the recombinant His-LytA at 10µg/mL at OD<sub>595nm</sub> 0.3-0.4.

The localizations of sfGFPop-LytA, sfGFPop-LytAAMI and sfGFPop-LytACBD were performed as follow : the recombinant proteins were added at 10 µg/ml in CY pneumococcal cultures at OD<sub>595nm</sub> 0.3-0.4. The incubations lasted from 4 min to 30 min at room temperature. After two washes in CY to discard unbound fluorescent proteins, the cells were resuspended into CY and immediately observed.

For labeling of newly synthesized peptidoglycan, cells were grown in CY at OD<sub>595nm</sub> 0.4 at 37°C/5%CO<sub>2</sub>, pelleted at room temperature for 2 min at 4500 g, resuspended and incubated for 3 min in CY supplemented with 2 mM HADA (KURU et al., 2012). After two washes in CY to discard unbound dye, the cells were resuspended into CY and immediately observed.

For labelling of newly synthesized teichoic acids, cells were grown in Cmed supplemented with 4 µg/ml choline at 37°C/5%CO<sub>2</sub> until OD<sub>595nm</sub> 0.4, then pelleted at room temperature for 2 min at 4500 g, resuspended and incubated for 5 min in Cmed supplemented with 4-10 µg/ml choline-alkyl (manuscripts submitted and in preparation) and 25 µM DIBO (Click-IT Alexa Fluor 594 DIBO Alkyne, for copper free click chemistry detection of azide - C10407). After two washes in Cmed to discard unbound dye, the cells were resuspended into CY and immediately observed. For pulse-chase experiment, labelling of newly synthesized teichoic acids was performed as previously described, sfGFPop-LytA recombinant protein at 10 µg/ml was added at the same time than the choline-alkyl and DIBO molecules. After resuspen-



sion into CY and immediate observation of a first aliquot, cells were incubated at 37°C/5%CO<sub>2</sub> and aliquots were observed after 20 and 40 min.

**Protein expression and purification.** Strain BL21(DE3) Rosetta pLysS Rare (CmR) of *E. coli* was transformed with the plasmids pET28-His-LytA (KanR), pADG14 (KanR), pADG141 (KanR), or pADG142 (KanR). Cells were grown in Luria Bertani medium and protein expression was induced at OD<sub>595nm</sub> 0.6 with 0.5 mM IPTG (isopropyl -D-thiogalactopyranoside) at 25°C overnight. Cells from 2-litres cultures were harvested by centrifugation, resuspended in 50 ml of a buffer containing 50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 25 mM imidazole, 10% glycerol and a protease inhibitor cocktail (Complete EDTA free, Sigma-Aldrich) and lysed using a Microfluidize M-110P (Microfluidics). The lysate was clarified by centrifugation (20 min at 39,191 x g at 4°C) and loaded onto a 10-ml Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) column (Qiagen). His-LytA proteins were eluted with a 25 mM to 500 mM imidazole gradient. Pooled fractions were concentrated and further purified by size exclusion chromatography using a Superdex S75 10/300 GL column (GE Healthcare) in 25 mM Tris-HCl (pH 8) and 150 mM NaCl.

**Fluorescence microscopy image acquisition and analysis.** Cells were grown at 37°C/5%CO<sub>2</sub> in CY to OD<sub>595nm</sub> 0.3, transferred to microscope slides, and observed at 37°C on an Olympus BX61 microscope equipped with a UPFLN 100 O-2PH/1.3 objective and a QImaging Retiga-SRV 1394 cooled charge-coupled-device camera.

Image acquisition was performed using the software packages Volocity. Images were analyzed using the open-source softwares MicrobeTracker (SLIUSARENKO et al., 2011) and Oufi (PAINTDAKHI et al., 2016) and processed with Adobe Photoshop CS5 and Image J. Demographs integrate the signal values in each cell. The cells were sorted by their length value and the fluorescence values were plotted as a heat map.

The pulse-chase in timelapse microscopy was performed using the CellASIC ONIX B04A-03 Microfluidic system (Merck-Millipore). Briefly, a glycerol stock of the R6 strain was inoculated in 5 mL of CY medium and grown to an OD<sub>600nm</sub> 0.05. A CellASIC B04A-03 Microfluidic Bacteria Plate was primed 10 min at a flow of 5 psi with CY to removed PBS. To load the cells, 50  $\mu$ L of culture at OD<sub>600nm</sub> 0.05 was loaded into the plate at 0.25 psi. Then, a constant flow of CY medium at 1 psi was applied during 1 hour for cell growth. For the pulse, GFP-LytA recombinant

protein at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was injected during 10 min at 3 psi. The plate was washed with CY during 5 min at 2 psi, then the flow was reduced to 0.25 during the chase. Images were acquired every 6 min using an automated inverted epifluorescence microscope Nikon Ti-E/B equipped with the "perfect focus system" (PFS, Nikon), a phase contrast objective (CFI Plan Apo Lambda DM 100X, NA1.45), a Semrock filter set for GFP (Ex : 482BP35 ; DM : 506 ; Em : 536BP40) a LED light source (Spectra X Light Engine, Lumencor), a cCMOS camera (Neo sCMOS, Andor) and a chamber thermostated at 37°C. Fluorescence images were captured and processed using Nis-Elements AR software (Nikon). GFP fluorescence images were false colored green and overlaid on phase contrast images.

**CBP elution by choline 2% and LytA quantification by immunoblotting.** For quantification of the cell-wall anchored LytA, cells were grown at 37°C in 50 ml of filtered CY and every 40 min, the OD<sub>595nm</sub> was measured and culture samples of 1 ml were withdrawn. The cells were centrifugated for 2 min at 5000 g and the pellet was resuspended into 10  $\mu\text{l}$  of CY containing or not 2% Choline. After an incubation period of 20 min under gentle mixing, the samples were centrifugated for 3 min at 5000 g and the supernatant containing the CBP eluted by 2% Choline was withdrawn. Fractions treated and non-treated with choline were analyzed by immunoblot and quantified with ImageJ. The samples were boiled in Laemmli for 5min, loaded on SDS-PAGE gel and run at 200 V for 30 min. The gel was transferred to a nitrocellulose membrane which was then blocked with 5% milk in PBS-T (phosphate-buffered saline with 0.1% Tween) (saturation solution) for 1h at room temperature. The membrane was incubated with an anti-LytA polyclonal rabbit antibody diluted in the saturation solution for 1h at room temperature. After three washes in PBS-T, the membrane was incubated with a goat anti-rabbit immunoglobulin coupled to the G-horseradish peroxidase) for 1h30 at room temperature. Protein was detected with the ECL horseradish peroxidase Western blotting detection kit. Quantitative analysis was realized with ImageJ.

**Sacculi purification and transmission electron microscopy.** Sacculi from *S. pneumoniae* R6 strain were prepared as described previously (MCPHERSON et POPHAM, 2003). 10  $\mu\text{L}$  of sacculi were incubated at 37°C for 1 min with 0 (Control) or 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of recombinant purified LytA for 1 min at 37°C in 100  $\mu\text{L}$  PBS. Samples were then applied to the clean side of carbon on mica (carbon/mica interface) and negatively stained with 2% (wt/vol) sodium silicotungstate (pH 7.4). A grid was placed on top of the carbon film, which was subsequently air-dried. Images were ta-

ken under low dose conditions with a CM12 Phillips electron microscope at 120 kV and a calibrated nominal magnification of 13,000 using an ORIUS SC1000 camera (Gatan, Inc.).

**Scanning and transmission electron microscopy.** SPH146 cells were grown to an OD<sub>492</sub> 0.3 in the presence of 2 M ComS\*, harvested by centrifugation, and washed once in C medium to remove excess ComS\*. The washed cells were resuspended in C medium with (2  $\mu$ M) or without ComS\* to an OD<sub>492</sub> of 0.04. From each of these cultures, 2-fold dilution series of the cells were prepared. In the series containing ComS\*, each dilution level contained the same amount of the peptide (2  $\mu$ M). Growth was followed spectrophotometrically, and 25 ml samples of cell culture were collected at time points when the growth rate of the tarIJ-depleted cells started to slow down compared to the ComS\*-induced cells. Cells were fixed by mixing cell culture and fix solution (2% paraformaldehyde [v v-1] and 2.5% glutardialdehyde [w v-1] in 0.1 M sodium cacodylat buffer, pH 7.4) in a 1 :1 ratio. After incubation at room temperature for 1 h, the cells were fixed overnight at 4°C. The fixed cells were washed three times in sodium cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4). For scanning electron microscopy, fixed cells were dehydrated with 70% and 90% ethanol for 10 min each, and then with 100% ethanol overnight. Following dehydration with ethanol, samples were subjected to critical point drying with liquid CO<sub>2</sub>. Then, samples were coated with Au-Pd and examined in a ZEISS EVO 50 EP scanning electron microscope. For transmission electron microscopy, fixed cells were post-fixed for 1 h at room temperature using 1% OsO<sub>4</sub> (w v-1) and 1.5% K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (w v-1) dissolved in dH<sub>2</sub>O. Following three washing steps in dH<sub>2</sub>O (3x10 min), cells were pre-stained for 30 min using 1% uranyl acetate. Next, cells were washed for 3 x 10 min in water, and dehydrated with a gradient series of ethanol comprising 10 min sequential incubations in 70%, 90% and 100% ethanol. Finally the cells were step-wise infiltrated in LR White resin as follows : LR White resin : EtOH in ratios 1 :3 for 30 min, 1 :1 overnight, 3 :1 for 4 h, and finally 100% LR White resin overnight followed by embedding in 100% LR White resin at 60°C overnight. Thin sections were cut with a diamond knife mounted on an ultra-microtome (LEICA, EM UC 6). The sections were counterstained with 1% KMNO<sub>4</sub> for 10 min. After staining, the grids were washed thoroughly in dH<sub>2</sub>O. The sections were examined in a FEI MORGAGNI 268 electron microscope. Samples from the control strain RH426 were prepared in exactly the same way as the tarIJ-depleted cells.

**Table 1**

Constructs	Genotype/description/sequence	Source
<b><i>S. pneumoniae</i> strains</b>		
R6		
R6 LytA-sfGFP	<i>bgaA::P<sub>cscD</sub>-lytA</i> (pJB3); Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	This work
R6 $\Delta$ <i>lytA</i>	<i>lytA::cat</i> ; Cat <sup>R</sup>	Pagliero <i>et al.</i> 2008
$\Delta$ <i>lytA</i> LytA-sfGFP	<i>lytA::cat</i> , <i>bgaA::P<sub>cscD</sub>-lytA</i> (pJB3); Cat <sup>R</sup> , pJB3, Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	This work
$\Delta$ <i>lytA</i> LytAE87Q-sfGFP	<i>lytA::cat</i> ; <i>bgaA::P<sub>cscD</sub>-lytAE87Q</i> (pJB31), Cat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	This work
$\Delta$ <i>lytA</i> LytA <sup>AMI</sup> -sfGFP	<i>lytA::cat</i> ; <i>bgaA::P<sub>cscD</sub>-lytA<sup>AMI</sup></i> (pJB33); Cat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	This work
$\Delta$ <i>lytA</i> LytA <sup>CBD</sup> -sfGFP	<i>lytA::cat</i> ; <i>bgaA::P<sub>cscD</sub>-lytA<sup>CBD</sup></i> (pJB34); Cat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	This work
<i>ftsZ-mKate</i>	R800 <i>ftsZ::ftsZ-mKate</i> ; Str <sup>R</sup>	In revision
RH426	$\Delta$ <i>comA</i> $\Delta$ IS1167::Janus, Ery <sup>R</sup> Kan <sup>R</sup>	Johnsborg <i>et al.</i> , 2009
RH1	$\Delta$ <i>comA::ermAM</i> , <i>egb::spc</i> , Ery <sup>R</sup> Spc <sup>R</sup>	Johnsborg <i>et al.</i> , 2008
RH14	$\Delta$ <i>comA::ermAM</i> , <i>egb::spc</i> , $\Delta$ <i>lytA::kan</i> , Ery <sup>R</sup> Spc <sup>R</sup> Kan <sup>R</sup>	Eldholm <i>et al.</i> , 2009
SPH125	<i>P<sub>comR</sub>::comR</i> , Janus between <i>cpsO</i> and <i>cpsN</i> , Ery <sup>R</sup> Kan <sup>R</sup>	Berg <i>et al.</i> , 2011
SPH130	SPH125, but contains the P <sub>1</sub> and P <sub>comR</sub> promoters before <i>comR</i>	Berg <i>et al.</i> , 2011
SPH131	SPH130, but with replacement of <i>luc</i> by the Janus cassette, Ery <sup>R</sup> Kan <sup>R</sup>	Berg <i>et al.</i> , 2011
SPH143	SPH131 but with replacement of the Janus cassette by <i>tarIJ</i> ( <i>spr1149/spr1148</i> ), Ery <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup>	This work
SPH144	SPH143, but with replacement of native <i>tarI</i> and <i>tarJ</i> by the Janus cassette, Ery <sup>R</sup> Kan <sup>R</sup>	This work
SPH145	SPH144, but with deletion of the Janus cassette, Ery <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup>	This work
SPH146	SPH145, but with replacement of <i>lytA</i> by a spectinomycin reresistance marker ( <i>aad9</i> ), Ery <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> Spc <sup>R</sup>	This work
<b>Plasmids</b>		
pADG0	[ <i>bgaA::P<sub>Zn</sub>-sfGFP</i> ], Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , AgeI, BssHIII, BsiWI	In revision
pJB3	From pADG0, [ <i>bgaA::P<sub>Zn</sub>-LytA-sfGFP</i> ], Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	This work
pJB31	From pJB3, [ <i>bgaA::P<sub>Zn</sub>-LytA<sup>E87Q</sup>-sfGFP</i> ], Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	This work
pJB33	From pJB3, [ <i>bgaA::P<sub>Zn</sub>-LytA<sup>AMI</sup>-sfGFP</i> ], Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	This work
pJB34	From pJB3, [ <i>bgaA::P<sub>Zn</sub>-LytA<sup>CBD</sup>-sfGFP</i> ], Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	This work
pCM2 (pLR39)		
pCM98 (pLR45)		
pADG12		
pADG14	8-His-sfGFPop-LytA; Kan <sup>R</sup>	This work
pADG141	8-His-sfGFPop-LytA <sup>AMI</sup> ; Kan <sup>R</sup>	This work
pADG142	8-His-sfGFPop-LytA <sup>CBD</sup> ; Kan <sup>R</sup>	This work
pET28-His-LytA	pET28a:: <i>his-lytA</i> Kan <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Philippe <i>et al.</i> , 2015
pDS-lytA	pRSET A with <i>lytA</i> cloned downstream of <i>T7/lac</i>	Berg <i>et al.</i> , 2011
<b>Oligonucleotides</b>		
pJB3For	CGCGCGCGCATGGAAATTAATGTGAGTAAATTAAG	This work
pJB3Rev	GCGCGTACGTTTTACTGTAATCAAGCCATCTGG	This work
FORoMJ62	ggtgaatggcttcaatcagttgaaccgctgcataggctcagc insertion of E87Q mutation in <i>lytA</i>	In revision
REVoMJ63	gctgagacctatgcagcgggtcaactgattgaagccattcaacc insertion of E87Q mutation in <i>lytA</i>	In revision
pJB33For	CAGTTTAAGCATGATATTGAGAACGGCTTGCGTACGACCGGTTCTA GGTGAAGAG	This work
pJB33Rev	CTCTTACCTTTAGAACCGTTCGTACGCAAGCCGTTCTCAATATCA TTAAACTG	This work
pJB34For	GCGGATCTTAAAGGAGGCGCGCATGACGATTGAAACAGGCTGGCAG G	This work
pJB34Rev	CTTCTGCCAGCCTGTTTCAATCGTCATGCGCGCCTCTTAAGATCCC	This work
pADG14For	CGCAAGCTT GAAATTAATGTGAGTAAATTAAGAAC	
pADG14REv	GCGCTCGAGTTATTATTTACTGTAATCAAGCCATCTGG	
pADG141For	GCATGATATTGAGAACGGCTTGACTAATAAATC GAGCACCACCACCAC	This work
pADG141Rev	GTGGTGGTGGTCTCGAGTTATTAGTCAAGCCGTTCTCAATATCAT	This work
pADG142For	CCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGATTGAAACAGGCTGGCAC GAATG	This work
pADG142Rev	CATTCTTCTGCCAGCCTGTTTCAATCAAGCTTGTCGACGGAGCTCG/ TCGG	This work
khh31	ATAACAAATCCAGTAGCTTTGG	Berg <i>et al.</i> , 2011
khh36	TGAACCTCCAATAATAAATAAATAAAT	Berg <i>et al.</i> , 2011
khh33	TTTCTAATATGTAACCTTCCCAAT	Berg <i>et al.</i> , 2011

khb34	CATCGGAACCTATACTCTTTAG	Berg <i>et al.</i> , 2011
Kan484F	GTTTGATTTTAAATGGATAATGTG	Johnsborg <i>et al.</i> , 2008
LytAF	TGTATCTATCGGCAGTGTGAT	Eldholm <i>et al.</i> , 2009
LytAR	TCAACCATCCTATACAGTGAA	Eldholm <i>et al.</i> , 2009
khb90		This work
khb91	ATTTATATTTATTATTGGAGGTCAATGATTTATGCAGGAATTCTT ATTGGGAAGAGTTACATATTAGAAAATTATACTTCCCACTAAAC ACTG	This work
khb92	AGAGACCAGCATCAGGATAC	This work
khb93		This work
khb94	CACATTATCCATTAATAAATCAAACCTATTTTCCTTTGTCTTAC AAGTATTTCTAGTATTATAGCACATTTAACTTTCCTTATGCTTT TGGAC	This work
khb95	TTAAATGTGCTATAATACTAGAAAATACTTGACTGGAGGTAA TTGTGGAG	This work
khb96	TTCACCTTGCTCTCCTTATAG	This work
khb97	CTCCACAATTAACCTCCAGTACCTATTTTCCTTTGTCTTAC	This work
khb98	GTAAGACAAAGGAGAAAATAGGTACTGGAGGTTAATTGTGGAG	This work

---

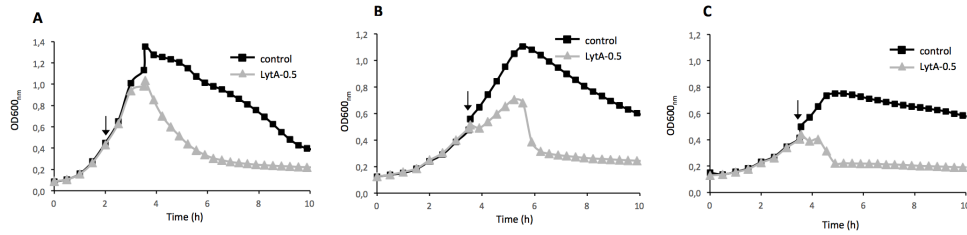
## 8.2.4 Results

### **Reduced choline concentration in the culture medium triggers sensitivity to LytA in growing pneumococci.**

To test to what extent TA would drive the activity of LytA, we first asked whether the pattern of TA present in the cell wall, or the level of choline decoration, might affect the PG sensitivity towards LytA. *S. pneumoniae* cells were cultured in media containing different concentrations of choline. CY medium (C-medium supplemented with 0.5 % of yeast extract) contains a concentration of choline at least superior to 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (C-medium contains 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of choline and the quantity of choline present in yeast extract is unknown). However, to control the concentration of choline, CDM medium was prepared containing 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  or 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  choline, corresponding respectively to CDM-Cho-5 and CDM-Cho-10 conditions (Fig. 8.1 page 174). Comparable growth curves were obtained in CY and CDM-Cho-10 media (Fig. 8.1A and 8.1B, black curves) while growth was reduced in CDM-Cho-5 (Fig. 8.1C, black curve) since exponential phase ended at OD600nm 0.8 compared to OD600nm 1.2-1.4 in CY and CDM-Cho-10. Interestingly, the lytic phase was almost inhibited in CDM-Cho-5 (Fig. 8.1C, black curve), indicating that the endogenous effect of LytA was altered.

As already shown by other investigators and ourselves (TOMASZ et WAKS, 1975; MELLROTH et al., 2012; in revision), the presence of exogenous LytA in pneumococcal culture does not affect the exponential growth phase rate but accelerates the onset of the lytic phase. We confirmed these observations when pneumococcal cells are cultured in the CY medium (Fig. 8.1A, grey curve). We then investigated whether the concentration of choline in the medium would influence the sensitivity of growing cells towards LytA. Pneumococcal cultures performed in CDM-Cho-10 and CDM-Cho-5 were supplemented with LytA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  final concentration) at mid-exponential phase (OD600nm 0.5) (Figs 8.1B and 8.1C, grey curves). Immediately after addition of LytA, a plateau was observed for about 30 min in both conditions but the optic density restarted to raise in CDM-Cho-10, meaning that the cells continued to grow, unlikely to the CDM-Cho-5 medium in which total cell lysis occurred (Figs 8.1B and 8.1C, grey curves). These data show that the quantity of choline present in the culture media affects the sensitivity of PG towards LytA cleavage.

Choline starvation should curtail the TA biosynthesis efficiency by reducing the amount of TA displayed at the cell surface, if as supposed, only TA decorated by



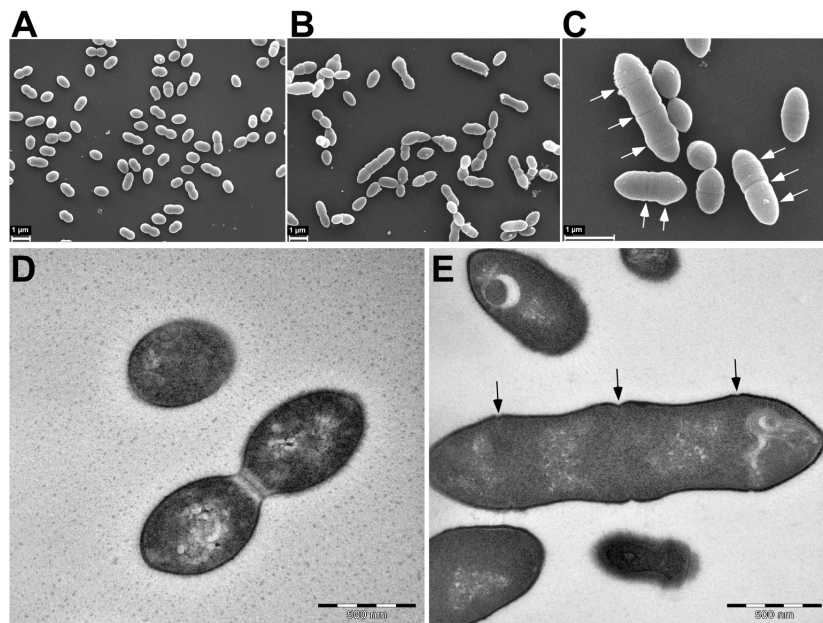
**FIGURE 8.1 – Effect of choline on pneumococci sensitivity to LytA-induced lysis.** **A.** Growth in CY, a choline-rich medium, in the absence or in the presence of LytA at 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . **B.** Growth in CDM medium, containing a choline concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , in the absence or in the presence of LytA at 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . **C.** Growth in CDM medium, containing a choline concentration of 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , in the absence or in the presence of LytA at 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

choline are exported to the cell surface. The other hypothesis would be that a similar amount of TA is present in the cell wall, but with a modified degree of choline decoration.

#### Reduced expression of *tarIJ* triggers LytA sensitivity in growing pneumococci.

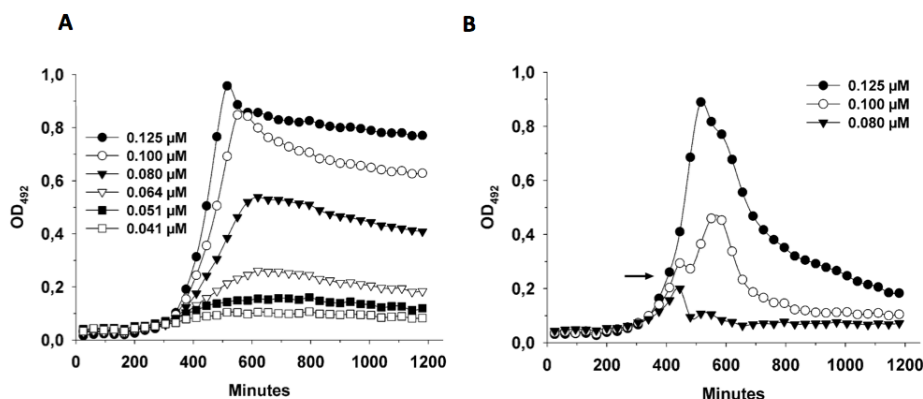
To discriminate between these two possibilities, we directly verified if the amount of TA at the cell surface would influence the sensitivity of pneumococcus to LytA. As teichoic acid is essential for growth in *S. pneumoniae*, we used a depletion system to construct a mutant strain *tarIJ*, in which the amounts of teichoic acid produced can be controlled by the extracellular concentration of an 8-aa peptide designated ComS\* (BERG et al., 2011). The genes, *tarI* and *tarJ*, were targeted because they encode a ribitol 5-phosphate cytidylyl transferase and a ribulose 5-phosphate reductase, respectively required for the synthesis of the teichoic acid precursor cytidine 5'-diphosphate (CDP)-ribitol (BAUR et al., 2009). Without CDP-ribitol available the synthesis of WTA and LTA will stop, resulting in growth arrest and cell death. The depletion of *tarI* and *tarJ* genes was performed in a pneumococcal strain deleted from *lytA* (SPH146). When grown in the presence of 2  $\mu\text{M}$  ComS\* the strain SPH146 grew normally and showed normal morphology (Figs. 8.2A and 8.2D page 175). In contrast, teichoic acid-depleted cells developed an elongated shape and appeared to have several septa (Fig. 8.2B, 8.2C and 8.2E). Transmission electron microscopy (TEM) of these cells revealed that they contained several false or aborted septum initiations, demonstrating that they struggled to divide (Fig. 8.2E). These results show that teichoic acids play a crucial role in septum formation in *S. pneumoniae*.

The LytA sensitivity of *tarIJ*-depleted cells was investigated by adding exogenous LytA to exponentially growing cultures when they reached OD492nm 0.25. First, the lowest ComS\* concentrations that supports normal or nearly normal growth of



**FIGURE 8.2** – Scanning (A, B and C) and transmission (D and E) electron micrographs of normal (A and D) and *tarIJ* depleted (B, C and E) *S. pneumoniae* cells. Cells grown in the presence of 2  $\mu$ M ComS\* (A and D) displayed the typical ovococcal shape of wild-type (WT) pneumococci. Depletion of *tarIJ* expression by removal of ComS\* from the growth medium (B, C and E) gave rise to severe morphological abnormalities and multiple false or aborted division zones (indicated by arrows). All cell samples were collected during exponential growth.



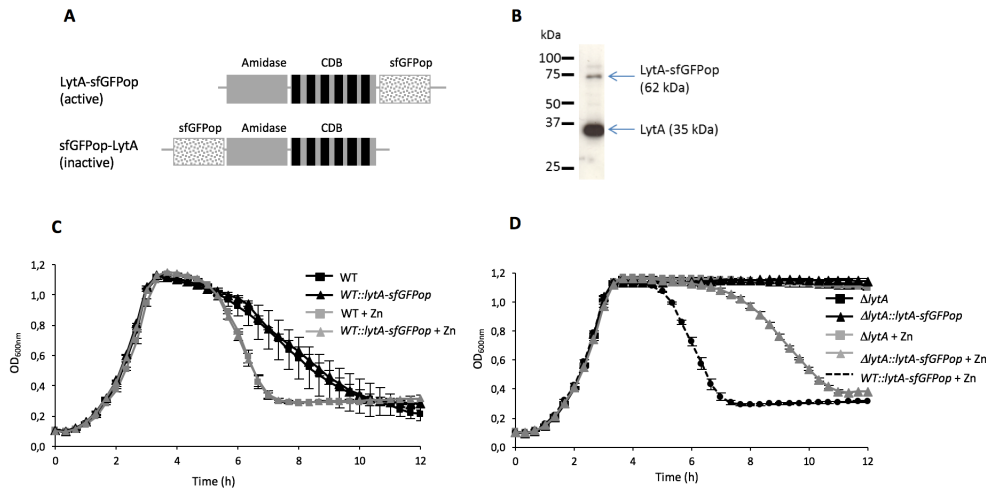


**FIGURE 8.3 – Reduced expression of *tarIJ* triggers *LytA* sensitivity in growing *S. pneumoniae*.** **A.** Impact of decreasing *TarIJ* expression on the growth of SPH146. *TarIJ* expression was regulated by growing the SPH146 cells in medium containing concentration of ComS\* ranging from 0.125 to 0.041 μM. **B.** *LytA*-sensitivity of SPH146 cells growing exponentially in medium containing 0.125, 0.100 and 0.080 μM ComS\*. Purified *LytA* (5 μg ml<sup>-1</sup>) was added to the cultures when they reached OD<sub>492</sub> 0.2 - 0.3, as indicated by the arrow.

the *tarIJ* strain were determined. *tarIJ* cells grown in the presence of 2 μM ComS\* were harvested by centrifugation, washed once in plain medium and resuspended to OD<sub>492nm</sub> 0.05 in the same medium containing concentrations of ComS\* ranging from 0.125 to 0.04 μM. Cultures grown in medium containing 0.125 and 0.1 μM ComS\* grew well, whereas the growth of cultures containing less ComS\* displayed impaired growth (Fig. 8.3A page 176). In a separate experiment, *LytA* (5 μg/ml) was added to the cultures when they reached OD<sub>492nm</sub> 0.25. As expected, *tarIJ* cells grown at the highest ComS\* concentration (0.125 μM) were resistant to *LytA* during exponential phase, while those grown at 0.1 and 0.08 μM were sensitive (Fig. 8.3B). At 0.1 μM only a portion of the cells was affected when *LytA* was added at OD<sub>492nm</sub> 0.25, but after reaching OD<sub>492nm</sub> 0.45 the whole culture lysed. These experiments indicate that actively growing pneumococci are sensitive to exogenous *LytA* when the level of teichoic acid in their cell envelopes is reduced to a critical level.

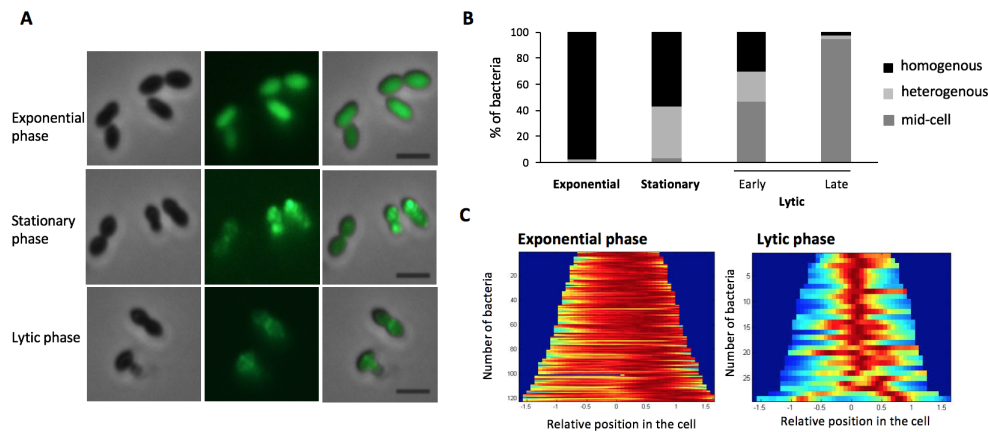
***In vivo* localization of *LytA* varies according to the pneumococcal growth phases.**

We showed that modification of the TA pattern at the cell surface, either due to a variability in the choline decoration motif and/or to the decreased amount of TA exposed in the cell wall, contribute to the *LytA* sensitivity of growing pneumococcal cells. We then asked whether this effect would be linked to the *LytA* positioning at the cell surface. To do so, we first analyzed the *in vivo* localization of *LytA*.



**FIGURE 8.4 – Functionalities of LytA constructs fused to sfGFPop.** **A.** Schematic representation of LytA topology. The N-terminal catalytic amidase domain is represented by the grey box. The C-terminal Choline-Binding Domain (CBD) of LytA contains six modules depicted by the black rectangles. When sfGFPop (dotted box) was fused at the C-terminal end of LytA (LytA-sfGFPop), the amidase activity was conserved, which was not the case when sfGFPop was fused at the N-terminal end of LytA (sfGFPop-LytA). **B.** Immunoblot with anti-LytA diluted 1/1000 of wild-type pneumococcal cells producing the ectopic form of LytA-sfGFPop under the control of the Zn-inducible promoter. **C.** Expression of Zn-inducible LytA-sfGFPop in wild-type strain. **D.** Expression of Zn-inducible LytA-sfGFPop in  $\Delta lytA$  strain.

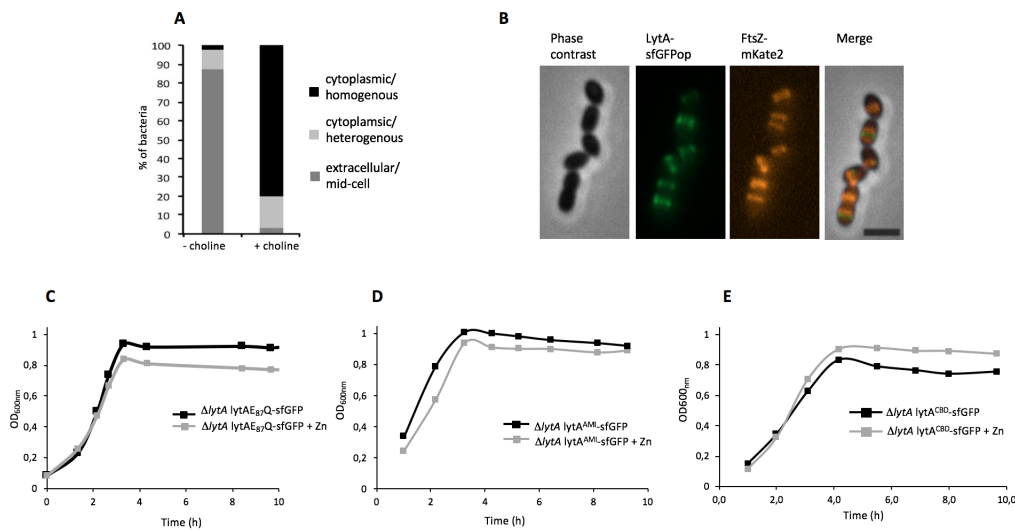
The 5' end of the *lytA* gene was fused to the superfolder green fluorescent protein (sfGFP) variant (PÉDELACQ et al., 2006) (Fig. 8.4A, supplemental page 177) which sequence was optimized for expression in *S. pneumoniae* (sfGFPop) and placed under the control of a Zn-inducible promoter (EBERHARDT et al., 2009). Pneumococcal wild-type (WT) strains carrying the plasmid encoding LytA-sfGFPop were grown in the presence of Zn. Expression level of the ectopic copy of *lytA* induced by Zn is lower than the endogenous expression level as already observed for other pneumococcal genes (EBERHARDT et al., 2009; MORLOT et al., 2013) (Fig. 8.4B, supplemental). Although added at low concentration (0.15 mM), addition of Zn accelerates the onset of cell lysis in the WT strain and in the strain expressing LytA-sfGFPop (Fig. 8.4C supplemental, grey curves). As expected, the mutant strain deleted in *lytA* does not display the lytic phase, independently on the presence of Zn or the plasmid encoding LytA-sfGFPop (Fig. 8.4D, supplemental). In the complemented strain, the expression of LytA-sfGFPop restored the outcome of the lytic phase, although to a lesser extent than in the WT strain (Fig. 8.4D, supplemental), most probably because the Zn-induction of LytA expression is lower than the endogenous. All together, these data indicate that the expression of an ectopic copy of LytA fused to sfGFPop is functional *in vivo*.



**FIGURE 8.5 – *In-vivo* localization of LytA varies according to the culture growth phase.** **A.** Fluorescence images of LytA-sfGFPop expressed in  $\Delta lytA$  cells withdrawn at different growth phases. Phase contrast (grey), GFP fluorescent signal (green) and merge (right) images are shown. Scale bars : 2  $\mu\text{m}$ . **B.** Distribution of bacteria displaying homogeneous, heterogeneous and mid-cell localization of LytA-sfGFPop during exponential phase (OD600nm 0,4), stationary phase (OD600nm 0,97), early (OD600nm 0,7) and late (OD595nm 0,23) lytic phases. N=98-170 bacteria per OD point. **C.** Demograph representation of the fluorescence signal profile of LytA-sfGFPop in cells sorted by increasing cell length (MicrobeTracker, MATLAB). Images analysis was performed on cells withdrawn during the exponential phase (upper demograph) and the late lytic phase (bottom demograph).

Localization of LytA-sfGFPop was followed along the pneumococcal growth phases. Aliquots of cultures of the  $\Delta lytA$  mutant strain expressing LytA-sfGFPop were withdrawn at different growth phases and analyzed by epifluorescence microscopy (Fig. 8.5A page 178). Homogenous localization of LytA-sfGFPop was observed in growing cells (exponential phase) while foci were detected in cells that stopped growing (stationary phase) leading to heterogeneous protein organization. Surprisingly, defined positioning of LytA-sfGFPop at mid-cell was observed on the remaining intact cells during the lytic phase. The quantification of the fluorescence distribution is shown in Fig. 8.5B. All growing cells display the homogenous LytA labeling. The proportion of this cell population decreases during the stationary growth phase in favor to an increasing amount of cells harboring the heterogeneous LytA pattern. During the lytic phase, LytA is positioned at the mid-cell of the large majority of non-lyzed cells. The representation of the fluorescence signal profile arranged by increasing cell length (demograph) of a growing cell population (Fig. 8.5D, upper panel) and of cells withdrawn during the lytic phase (Fig. 8.5D, lower panel) illustrate the homogenous and the mid-cell positionings of LytA-sfGFPop, respectively.

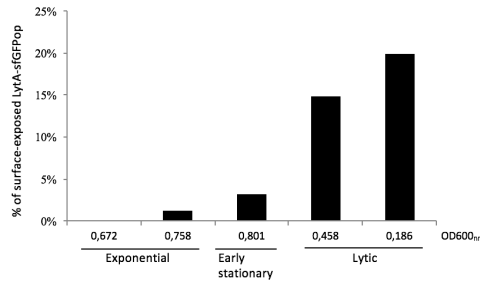
We then analyzed the subcellular localization of LytA-sfGFPop. To do so, cells withdrawn during the lytic phase were incubated with 2 % choline, a quantity of



**FIGURE 8.6 – LytA is released in the medium and binds at the surface of non-lyzed cells at the mid-cell position** **A.** Cells withdrawn during the exponential, stationary and lytic phases were incubated with 2% choline chloride to elute the CBPs associated to TA. After centrifugation, the supernatant fractions were analyzed by immunoblot using an anti-GFP antibody and the quantification was performed by ImageJ. The percentage of LytA-sfGFPop exposed at the cell surface was calculated in respect to the total amount of expressed fusion protein. **B.** WT cells expressing LytA-sfGFPop were mixed with cells deleted from *lytA* and expressing FtsZ fused to a red fluorescent protein (mKate2) at the ratio 2 :1. The growth of the mixed culture was pursued at 37°C until and aliquots were withdrawn when the culture entered the lytic phase. Phase contrast (grey), GFP fluorescent signal (green), mKate2 (red) and merge (right) images are shown. Scale bars : 2  $\mu\text{m}$ . **C.** Growth curves of the  $\Delta\textit{lytA}$  strain transformed with the Zn-inducible plasmid encoding the inactive form of LytA, LytAE87Q, in the absence or the presence of 0.15 mM Zn. **D.** Growth curves of the  $\Delta\textit{lytA}$  strain was transformed with the Zn-inducible plasmid encoding the amidase domain of LytA, in the absence or the presence of 0.15 mM Zn. **E.** Growth curves of the  $\Delta\textit{lytA}$  strain was transformed with the Zn-inducible plasmid encoding the CBD domain of LytA, in the absence or the presence of 0.15 mM Zn.

choline sufficient to compete with the choline-TA associated, leading to the elution of CBPs from the cell surface. The percentage of cells displaying homogenous, heterogenous and mid-cell fluorescence signal was determined before and after treatment with 2 % choline (Fig. 8.6A page 179). The most important modification relied on the total loss of the mid-cell pattern after choline treatment, while the heterogenous profile remained unchanged. This results indicates that the LytA-sfGFPop positioned at the mid-cell is extracellularly exposed in contrast to the heterogenous pattern relied to a cytoplasmic localization. The increase of cells proportion displaying homogenous localization of LytA-sfGFPop after choline treatment suggests that the cells with a midcell localization still contain cytoplasmic LytA-sfGFPop.

**LytA is released in the medium and binds at the surface of sibling non-lyzed cells at mid-cell position.**



**FIGURE 8.7 – Quantification of released LytA.** Pneumococcal  $\Delta lytA$  cells expressing LytA-sfGFPop were withdrawn during the exponential, stationary and lytic phases (OD600nm as indicated) and were incubated with 2% choline chloride to elute the CBPs associated to TA. After centrifugation, the supernatant fractions were analyzed by immunoblot using an anti-GFP antibody and the quantification was performed by ImageJ. The percentage of LytA-sfGFPop exposed at the cell surface was calculated in respect to the total amount of expressed fusion protein.

A complementary experiment was performed to confirm this result. Mid-exponential cultures of the WT strain expressing LytA-sfGFPop and the  $\Delta lytA$  mutant strain expressing FtsZ fused to a red fluorescent protein (mKate2) were mixed at a ratio of 2 :1. Growth of the mixed culture was pursued at 37°C until the lytic phase was reached. Images of cells withdrawn at that stage are presented in Fig 5B. Cells display red and green fluorescence at the mid-cell position, indicating that LytA-sfGFPop associates in trans at the septal site of sibling non-lyzed cells.

We then proceeded to the quantification of the amount of LytA-sfGFPop associated to the cell surface. The CBPs were eluted with 2% choline and these elution fractions were analyzed by Western with an anti-LytA antibody. The release of LytA-sfGFPop is initiated between the late exponential and the early stationary phases (Fig. 8.7 page 180, supplemental) as previously shown (MELLROTH et al., 2012). Furthermore, the release significantly increases during the lytic phase reaching up to 20 % of the total protein expressed.

**Both the amidase and the CBD domains are required to release LytA independently from the enzymatic function.**

We addressed the question of the molecular determinants responsible for the release and the lytic activity of LytA *in vivo*. To do so, different variants of LytA fused to sfGFPop were expressed in the  $\Delta lytA$  mutant strain and the growth profiles of each strain were analyzed. As expected, the inactive form LytAE87Q-sfGFPop did not complement the lytic phenotype, confirming that the enzymatic activity of LytA is necessary to induce cell lysis (Fig. 8.6C page 179). However, this strain displayed comparable features to the WT strain as the same 3-phases localization pattern was observed and similar amounts of LytAE87Q-sfGFPop was released into the medium

and associated to the cell surface (data not shown). These data indicate that the release of LytA is not related to the amidase activity.

To further investigate the functional properties of LytA, the catalytic domain amidase (Ami) and the Choline-Binding Domain (CBD) were individually fused to sfGFPop and expressed in the  $\Delta$ lytA mutant strain. Neither LytAAMI-sfGFPop nor LytACBD-sfGFPop were able to induce cell lysis (Figs. 8.6D, 8.6E). Few cells expressing the individual LytA domains displayed the typical reorganization of the fluorescence in the cytoplasm and only LytACBD-sfGFPop was shown to be associated to the cell surface (data not shown).

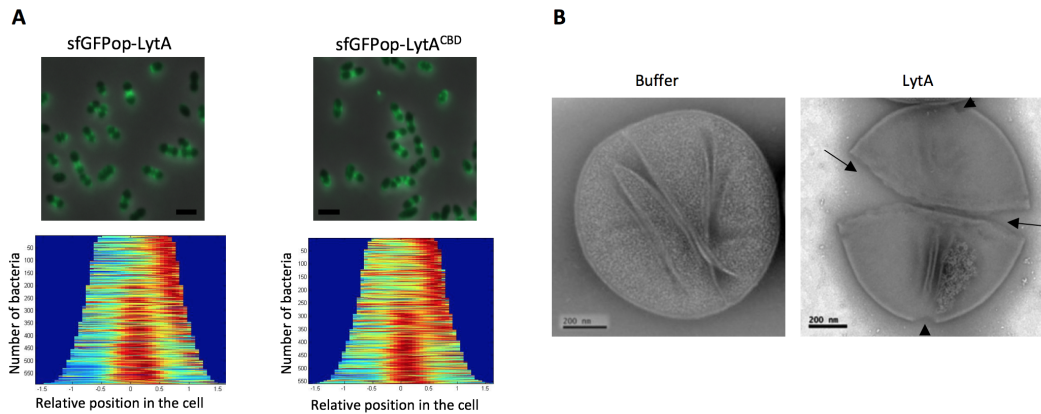
Altogether, these data indicate that the release of LytA is not dependent from the amidase enzymatic activity and that LytA should be anchored to TA by the CBD to exert its amidase activity leading to cell lysis.

**The localization of LytA at the cell surface is triggered by the association to TA through the CBD.**

Since the lytic activity of LytA is dependent on its binding to TA, we sought to analyze the molecular determinants driving the localization of LytA at the cell surface. To do so, we exploited the property of the CBPs to associate to TA when added exogenously to pneumococcal cells. The full-length LytA and the individual CBD and amidase domains were fused to the sfGFPop at the N-terminal ends and expressed in *Escherichia coli*. The recombinant proteins sfGFPop-LytA (Fig. 8.4 p. 177), sfGFPop-LytACBD and sfGFPop-LytAAMI were purified to homogeneity. We verified that the amidase activity was abolished in the sfGFPop-LytA construct in order to focus only on the binding property of LytA and not on the cleavage of the PG amide bond (data not shown). The fluorescent proteins were tested for their ability to associate to growing pneumococcal cells (Fig. 8.8A page 182). No binding of sfGFPop-LytAAMI was observed confirming that the isolated catalytic domain is not able to attach to the cell surface (data not shown). The protein sfGFPop-LytACBD was shown to associate to the cell surface with a pattern similar to the one of the full-length sfGFPop-LytA (Fig. 8.8A).

In these experimental conditions, we verified that sfGFPop-LytA and sfGFPop-LytACBD were bound to choline residues on TA since no fluorescence was observed in the presence of 1% choline (data not shown). The demographs representations of the signal profiles of sfGFPop-LytA and sfGFPop-LytACBD in cells arranged by increasing cell length clearly show a localization at the mid-cell as well as on one pole (Fig. 8.8A).

These data indicate that the TA recognition property is carried by the CBD and

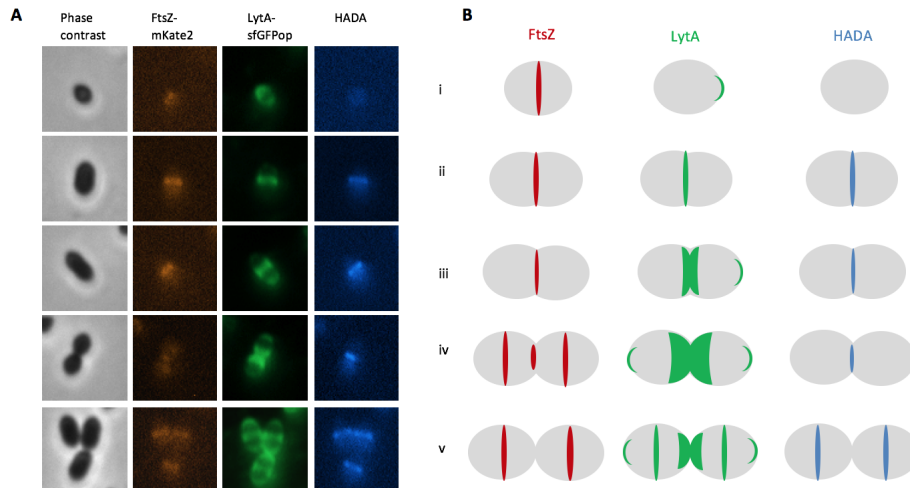


**FIGURE 8.8 – Localization of LytA and distribution of the cell wall cleavage sites.** **A.** The CBD is sufficient to trigger localization of LytA. WT cells in exponential growth phase were incubated with sfGFPop-LytA or sfGFPop-LytA<sup>CBD</sup> recombinant proteins (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Merge image of fluorescence and phase contrast views are shown. Scale bars : 2  $\mu\text{m}$ . Demograph representation of the signal profile of sfGFPop-LytA and sfGFPop-LytA<sup>CBD</sup> in cells sorted by increasing cell length (MicrobeTracker, MATLAB). **B.** Electron micrographs of *S. pneumoniae* sacculi incubated 1 min at 37°C with buffer or with 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of recombinant purified LytA. Cleavage of the cell wall by LytA at both sides of the mid-cell sites are indicated by arrows and at the cell pole by arrow heads.

that the specific localization of LytA is only dependent on the TA-CBD interaction. In non-growing cells withdrawn in stationary phase, sfGFPop-LytA positions only at the mid-cell corresponding to the active cell wall synthesis sites before cells stopped dividing (data not shown). Although neither TA nor PG are synthesized in stationary phase, LytA might keep the capability to recognize some specific TA species formerly synthesized during the exponential phase. We then sought to rely the localization pattern of LytA with the enzymatic activity. Purified sacculi prepared from pneumococcal growing cells were purified and digested with recombinant LytA (Fig. 8.8B). Electron microscopy observation clearly showed a septal and polar cleavage by the autolysin LytA. Thus, the cleavage sites correspond to the septal and polar positioning of the recombinant sfGFPop-LytA observed.

#### **LytA binds to septal cross-wall.**

To investigate in more detail the distribution pattern of LytA at the cell surface, we co-localized the division machinery using FtsZ-mKate2, the regions of active PG synthesis labeled by short incubation times with fluorescently labelled D-amino acids (HADA) (KURU et al., 2012) and sfGFPop-LytA. The protein sfGFPop-LytA and HADA were added to cells expressing FtsZ-mKate2. The incubation lasted for 4 min before washing and observation (Fig. 8.9 page 183). At the pre-division stage (i), FtsZ-mKate2 is positioned at the septal site although no septal PG has been yet synthesized and sfGFPop-LytA is mainly detected at one cell pole. The early

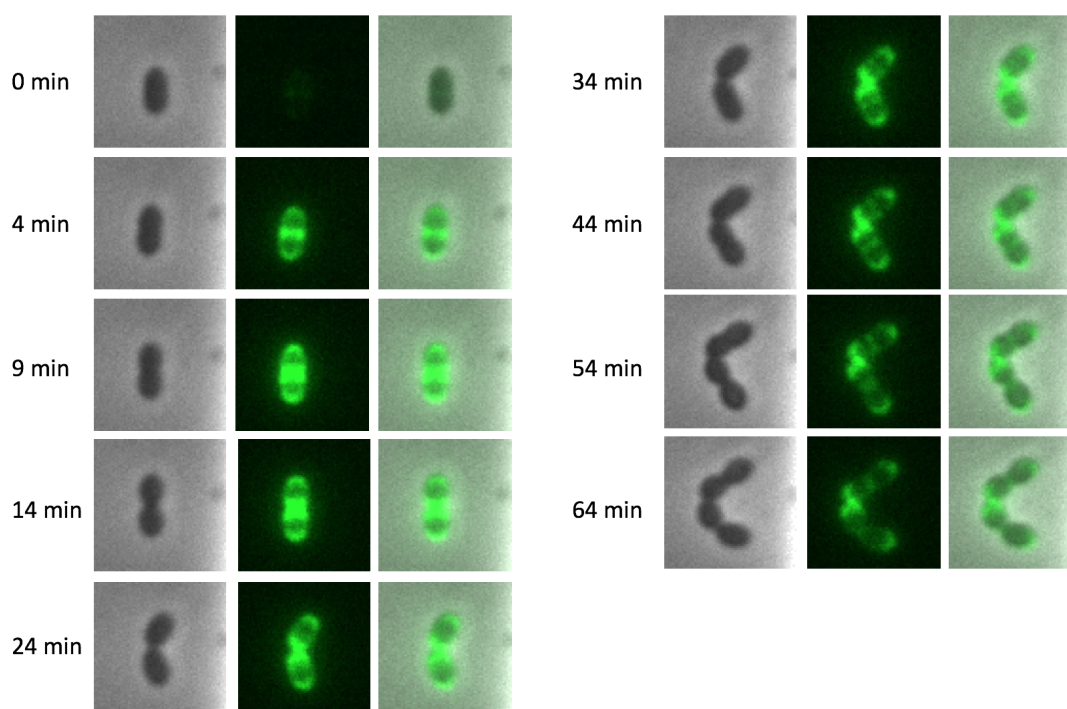


**FIGURE 8.9 – LytA is associated to newly synthesized cell wall in growing cells.** **A.** sfGFP-LytA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and HADA (500  $\mu\text{M}$ ) were added to pneumococcal cells expressing FtsZ-mKate2 and incubated for 4 min at 37°C before washing and fluorescence microscopy imaging. Phase contrast (grey) and fluorescent signals of mKate2 (red), GFP (green) and HADA images are shown. Scale bars : 1  $\mu\text{m}$ . **B.** Schematic representation of cell division stages (i to iv) together with the localization of FtsZ (red), LytA (green) and HADA (blue).

division stage (ii) is launched when cross-wall PG synthesis at the septal site initiates cell constriction, the septal site is also occupied by FtsZ-mKate2 and sfGFPop-LytA. As the peripheral growth progresses, sfGFPop-LytA is present on both sides of the cross-wall site (iii). FtsZ-mKate2 is soon repositioned at the septal sites of the daughter cells (iv) before de novo association of sfGFPop-LytA and HADA to these new septal sites (v). In the meantime, a population of sfGFPop-LytA remains associated to the former parental septal site, which corresponds to the new poles of the daughter cells (v). As expected, we observed that FtsZ positioning preceded PG synthesis. Interestingly, once sfGFPop-LytA associates to the cell wall at the mid-cell position, no dissociation occurs since the labeling is still conserved at the cell poles (former septal sites). Furthermore, the septal localization of sfGFPop-LytA is concomitant to the PG synthesis reported by HADA. Altogether, these data suggest that in growing cells, sfGFPop-LytA recognizes and binds in a durable manner to newly synthesized TA associated to the septal cross-wall and not to the peripheral-synthesized cell wall.

We investigated in real-time the localization of sfGFPop-LytA during cell division in a microfluidic system. sfGFPop-LytA was pulse-injected on cells before extensive wash with CY medium. The localization of sfGFPop-LytA is followed on a single cell throughout a complete cell cycle (Fig. 8.10 page 184). Comparable localization pattern was observed : sfGFPop-LytA associates to the newly synthesized cross-





**FIGURE 8.10 – Long-lasting association of LytA to the nascent cell wall.** Time-lapse images of WT cells labelled by sfGFPop-LytA (green) in a microfluidic system. sfGFPop-LytA was pulse-injected on cells before extensive wash with CY medium. The movie shows an overlay of GFP (green) and phase-contrast (grey) images. Stills are from Supplemental video S1. Scale bar : 1  $\mu\text{m}$ .

wall at the septal site (Fig. 8.10 frame 4 min, early division stage) and remains associated to this position, which under the progress of the cell cycle correspond to the cell poles (Fig. 8.10 frames 24 min to 64 min). Free sfGFPop-LytA most probably remained present in the microfluidic system since faint labeling at the new septal site of daughter cells is also detected (Fig. 8.10 frame 34 min). These single-cell observations confirm that sfGFPop-LytA is able to associate to nascent cross-wall.

#### **LytA binds to newly synthesized TA.**

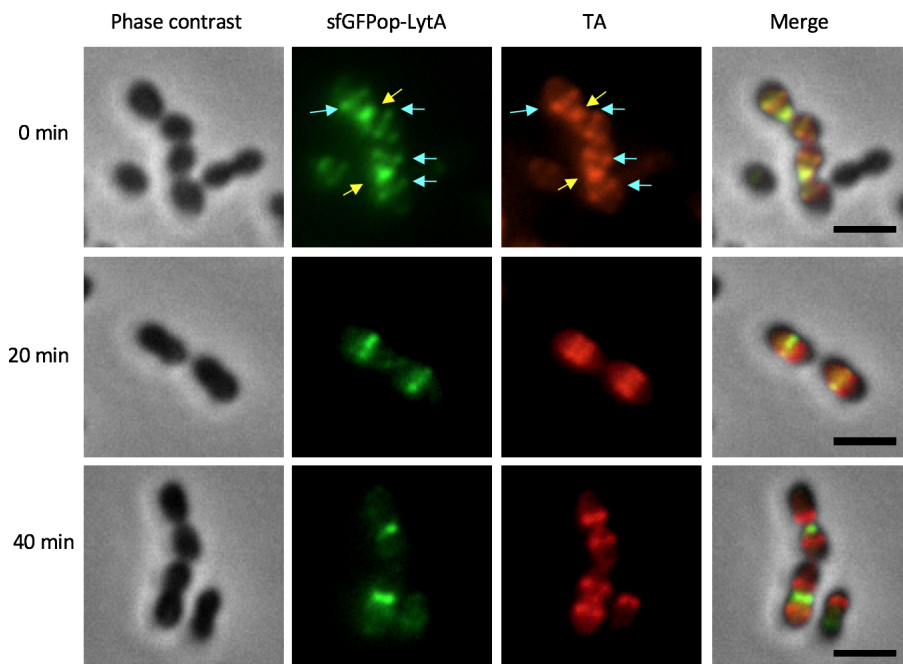
Although sfGFPop-LytA is positioned at the nascent PG septal growth site, its cell wall receptors are the TA molecules. We then sought to detect if TA molecules were indeed present at the septal site. To investigate the synthesis of TA in live cells, we have developed a method to metabolically label TA by click chemistry. The choline-growth dependency of *S. pneumoniae* has been exploited to incorporate choline molecules bearing small functional groups ready for click chemistry when incorporated into the TA polymers. Using Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, fluorescent reporters were grafted to TA decorated with the chemically modified choline molecules in a specific and selective manner (submitted). This method has been adapted to live cells using copper-free bioorthogonal click reaction and fluores-

cent reporter such as DIBO-Alexa Fluor 594 (in preparation). Briefly, pneumococcal cells grown in the presence of normal choline were washed and incubated for 4 min with choline-N3, DIBO-Alexa594 and sfGFPop-LytA at 37°C. After two washes, cell growth was pursued in Cmed supplemented with 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  choline at 37°C for different periods of time. Microscopy observations were performed immediately after the 4-min pulse period (0 min) and after a chase duration of 20 min and 40 min (Fig. 8.11 page 186). At  $t_0$ , sfGFPop-LytA is perfectly co-localized with the newly synthesized TA positioned at the parental (yellow arrow) and daughter (cyan arrows) division sites. After a 20-min chase period, the TA ring had split into two rings that move apart as PG synthesis elongates the cell while sfGFPop-LytA remained associated to the site of active cell wall septal synthesis. At a 40-min chase period, the labeled TA had moved to the next equatorial site, while sfGFPop-LytA was positioned to the former parental septal site. Similar observations were achieved with sfGFPop-LytACBD (Fig. 8.12 page 187, supplemental) showing that the dynamics of LytA localization is independent from the amidase activity.

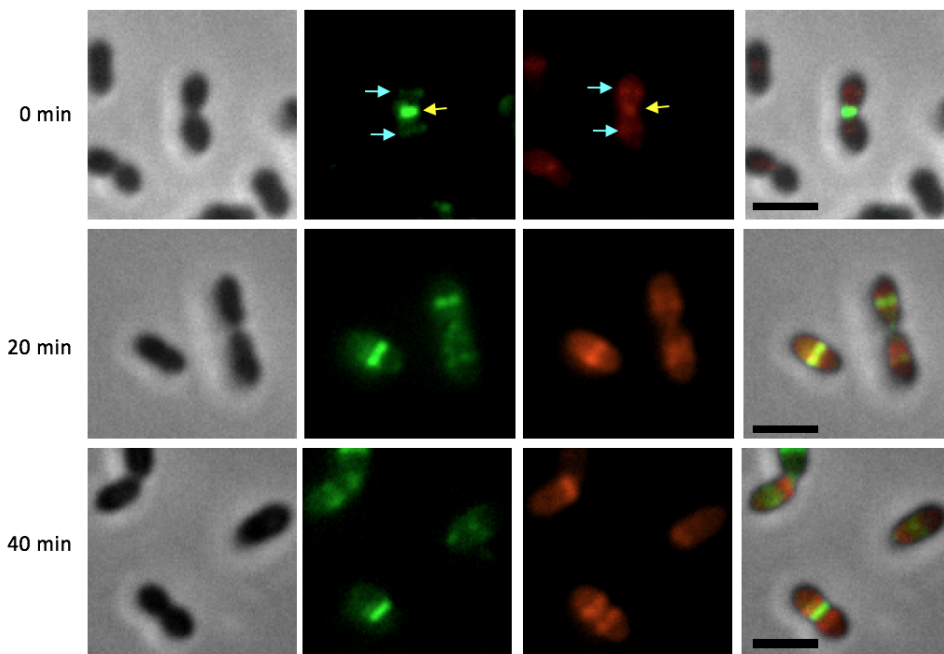
These observations confirm that sfGFPop-LytA preferentially associates to newly synthesized TA at the septal site and remains localized at this site all along the cell cycle which implied that sfGFPop-LytA should associate to these TA species, dissociate and bind to the newer TA molecules during cell growth.

## 8.2.5 Discussion

A characteristic of the pneumococcal growth in laboratory culture condition is the occurrence of autolysis (TOMASZ, 1968), launched several hours after the beginning of the stationary phase and induced by the amidase LytA, which cleaves the amide bond between MurNAc and L-alanine and D-Alanine (Howard and Gorder1974). Pneumococcal cells are protected from the lysis induced by LytA during the exponential growth phase but these protective features are lost upon entry into the stationary phase (TOMASZ et WAKS, 1975; MELLROTH et al., 2012). Despite the long-standing identification of the role of LytA as the major pneumococcal autolysin, the molecular mechanisms of its regulation are still largely misunderstood. We recently demonstrated that O-acetylation of the MurNAc residues protects the peptidoglycan from cleavage of the amide bond by LytA in *S. pneumoniae* (in revision). In this work, we show that the sensitivity of growing pneumococcal cells towards LytA is challenged by the level of TA present at the cell surface. The modulation of the concentration of choline into the culture medium impacts the activity of LytA : the depletion in choline increases the sensitivity of cells to LytA-induced lysis. This effect is not correlated to the quantity of LytA bound at the cell surface since in



**FIGURE 8.11 – LytA binds to newly synthesized TA positioned at the septal cross-wall site.** Pneumococcal cells grown in the presence of normal choline were washed and incubated for 4 min with choline-N3, DIBO and sfGFPop-LytA at 37°C in Cmed-choline. After two washes, cell growth was pursued in Cmed at 37°C. Microscopy observations were performed immediately after the 4-min pulse period (0 min) and after a chase duration of 20 min and 40 min. Phase contrast (grey), fluorescent signals of TA labelled with DIBO-Alexa594 (red), GFP (green) and merge images are shown. The parental cross-wall septal site is indicated by yellow arrows and the daughter new septal site by cyan arrows. Scale bars : 2  $\mu\text{m}$



**FIGURE 8.12 – The CBD of LytA binds to newly synthesized TA positioned at the septal cross-wall site.** Pneumococcal cells grown in the presence of normal choline were washed and incubated for 4 min with choline-N3, DIBO and sfGFPop-LytACBD at 37°C in Cmed-choline. After two washes, cell growth was pursued in Cmed at 37°C. Microscopy observations were performed immediately after the 4-min pulse period (0 min) and after a chase duration of 20 min and 40 min. Phase contrast (grey), fluorescent signals of TA labelled with DIBO-Alexa594 (red), GFP (green) and merge images are shown. The parental cross-wall septal site is indicated by yellow arrows and the daughter new septal site by cyan arrows. 2  $\mu\text{m}$

conditions where TA would be poorly decorated by choline (low choline concentration), less LytA molecules would bind, then reducing LytA-induced lysis, yet the opposite effect was observed. The most probable interpretation would arise from the model of choline dependency of pneumococcal growth. Based on the identification of a TA pathway in choline-independent pneumococcal strains, it has been proposed that the flippase TacF would specifically transport TA loaded in choline across the membrane (DAMJANOVIC et al., 2007; GONZÁLEZ et al., 2008; KHARAT et al., 2008; DENAPAITE et al., 2012 for review). Consequently, the choline depletion would result in the lethal block of TA synthesis, or TA translocation across the membrane. We indeed observed a reduced growth rate in the culture containing only 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  choline.

The TarI and TarJ enzymes are involved in the first steps of TA synthesis by producing the activated ribitol (BAUR et al., 2009). Although both *tarI* and *tarJ* genes are essential (ZALACAIN et al., 2003), we succeeded in generating viable pneumococcal strains depleted in *tarI* and *tarJ* genes. This *tarIJ* mutant strain hence displays very low amount of TA and increased sensitivity towards LytA in a comparable manner to the condition of choline starvation. Altogether, these results indicate that when the amount of TA is strongly reduced in the cell wall, the structure of PG might be modified to favor the access of LytA to the targetted amide bonds. We described a similar effect when MurNAc residues of the PG are not O-acetylated (in revision).

The *tarIJ* mutant strain display shape defects confirming the roles of TA in cell morphology and cell division. Indeed, bacteria depleted in TA present abnormal cell forms and sizes, irregular cell wall thickness and abnormal septa positioning, strongly supporting that the biosynthesis of PG and TA should be coordinated to achieve efficient building of the cell wall. In addition, the failure of mutants to effectively divide and separate during cell division implicates a role for TA in coordinating the localization, stability, and/or activity of PG hydrolases. WTA or LTA depletions could be achieved in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* by inactivation of the first-acting genes involved in the respective biosynthetic pathways, while the combination of the two deletions appeared to be lethal, indicating that TA are essential in the formation of the cell wall and/or for cell survival (D'ELIA et al., 2006b; D'ELIA et al., 2006a; GRÜNDLING et SCHNEEWIND, 2007; SCHIRNER et al., 2009; OKU et al., 2009). *B. subtilis* WTA mutants were affected in cell elongation (D'ELIA et al., 2006b) while septation and cell division were abnormal

in LTA mutants ((SCHIRNER et al., 2009) suggesting that WTA and LTA would be specialized for elongation and division processes, respectively. This observation seems to be restricted to Bacilli species since *S. aureus* blocked in WTA synthesis have extensive defects in septation and cell separation (CAMPBELL et al., 2011). Further evidences suggesting that TA synthesis is coupled to cell division arise from the observation that the localization of proteins involved in the WTA and LTA synthesis in *B. subtilis* displayed a pattern similar to that of nascent PG at the division site (FORMSTONE et al., 2008 ; SCHIRNER et al., 2009).

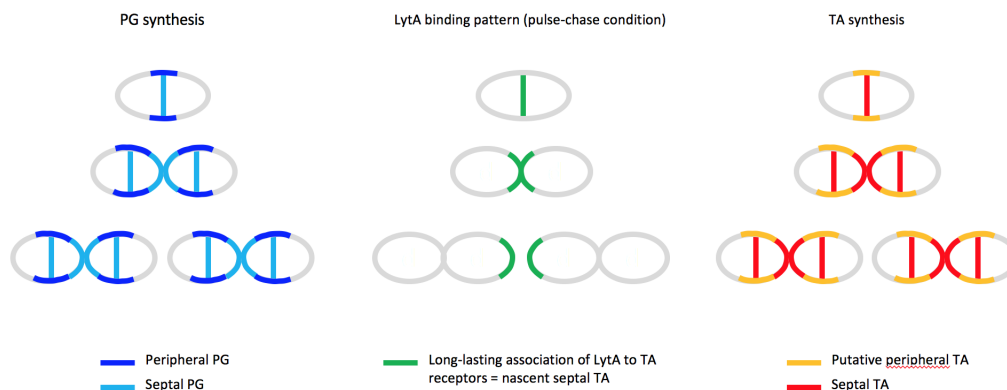
A functional link between TA and PG hydrolases during cell division has been highlighted in *B. subtilis* and *S. aureus* (YAMAMOTO et al., 2008 ; KIRIYAMA et al., 2014 ; SCHLAG et al., 2010). Cell separation in *B. subtilis* depends on the cleavage of PG by DL-endopeptidases among which LytF plays an active role. It was shown that LytF binding to PG as well as its sidewall subcellular localisation were inhibited by WTA (YAMAMOTO et al., 2008) and recently, a comparable effect by LTA was described (KIRIYAMA et al., 2014). The staphylococcal bifunctional autolysin Atl is localised at the septal region where it exerts its PG hydrolytic activities to efficiently allow cell separation. The positioning of Atl is regulated by WTA : by preventing binding of Atl to the old cell wall but not to the cross-wall site, WTA favors the separation of daughter cells (SCHLAG et al., 2010). Lastly, WTA by contributing to the proton-binding capacity of *S. aureus* cell walls, influence the autolysis rate via the major autolysin Atl (BISWAS et al., 2012). The sum of these data indicates that TA impact cell morphogenesis by controlling PG remodeling by directing the subcellular localization of key PG hydrolytic enzymes. Whether the PG hydrolases directly bound to TA and is the association required to guide the positioning of the enzymes to the right place at the right time during the cell cycle is still unclear.

We addressed these questions by investigating the localization of LytA *in vivo* and *in vitro*. For the first time, we described the localization of LytA fused to sfGFPop *in vivo* and observed that it varied according to the growth phases. LytA was homogenously diffused into the cytoplasm during the exponential phase. During the progression of the stationary phase, the fluorescence was reorganized into micro-domains, either associated to the inner face of the cytoplasmic membrane or randomly distributed into the cytoplasm. When released during the lytic phase, LytA-sfGFPop binds at the surface of non-lyzed sister cells at mid-cell position. The analysis of LytA subcellular distribution confirmed the data previously published (MELLROTH et al., 2012) : LytA starts to be released at the end of the exponential

phase, growing amount of the protein is present in the medium and associates to neighbouring cells until a threshold is reached during stationary phase leading to the autolysis of the entire population. The inactive form of LytA displayed an *in vivo* localization pattern and an association level at the cell surface comparable to the LytA active form, indicating that the release of LytA is not dependent from the amidase activity. However, both the individual amidase and CBD domains are required to the release of LytA, suggesting that LytA needs to be anchored to the TA by the CBD to exert its amidase activity leading to cell lysis.

We exploited the characteristic of the CBPs to bind to choline-associated TA when added exogenously to pneumococcal cells, in a non-covalent and reversible manner. The binding pattern of LytA fused to sfGFPop was followed in diverse conditions. First, the full-length LytA and isolated CBD were compared. Similar behaviors were observed, indicating that the localization of LytA at the cell surface is triggered by the association to TA through the CBD. Fluorescence imaging of LytA-sfGFPop bound to live cells was performed in different experimental set-ups : classical slide mounting ("static condition"), microfluidic system coupled to video-microscopy and pulse-chase conditions. In all cases, which reinforces the confidence in the results, we observed that LytA is present in the hot spot of active cross-wall synthesis. Since LytA is specifically associated to TA, it can be proposed that LytA binds to newly synthesized TA incorporated into the nascent cross-wall.

To confirm this hypothesis, we sought to analyze the TA synthesis in live cells and compare with the LytA localization pattern. Recently, we developed a method to label pneumococcal TA by exploiting the choline-growth dependency of *S. pneumoniae* and the copper-dependent click chemistry (submitted). An adaptation of this method allowed us to localize by video microscopy in time-lapse observations, the dynamics of TA biosynthesis (in preparation). In this present work, this method has been used to co-localize neo-synthesized TA and LytA. Pulse-chase experiments revealed that the synthesis of TA occurs at the septal site, confirming the elegant pioneer work performed by Briles et Tomasz in 1970 (Fig. 8.13 page 191). Co-localization data show that LytA binds to TA synthesized in the septal site where PG cross-wall is also formed. The LytA association to these TA species embedded into the nascent cross-wall is of high affinity since the protein remains associated long after the cross-wall had moved to the cell pole due to the peripheral growth (Fig. 8.13 page 191). In non-growing cells, LytA was associated to mid-cell, a pattern reminiscent to the one observed with the endogenous form of fluorescent LytA



**FIGURE 8.13 – Model of the LytA association to nascent septal TA.** In *S. pneumoniae*, two machineries act to complete the PG synthesis (left panel). Both septal and peripheral synthesis occur at the division site at mid-cell. As the new septal PG (cyan) is inserted, the cells elongate due to the peripheral PG (blue) synthesis with the consequence that the old poles (grey) are pushed apart. We observed in this work that TA synthesis (right panel) takes place at the septal site (red). Since TA are present all over the cell surface, TA molecules should also be present in the peripheral cell wall (orange) although these species are not detected in our experimental conditions. The localization pattern of LytA displayed during the pulse-chase experiment is figured in the middle panel. sfGFPop-LytA was incubated for 4 min with pneumococcal cells, the cells were washed and growth was pursued at 37°C. For clarity reason, the stage (i) has been chosen as the starting point of the division cycle. LytA binds to the nascent septal TA and remains associated to these same TA species all along the progress of cell division.

when bound to sibling non-lyzed cells (Fig. 8.6B p. 179).

Although TA are present all over the cell surface (BRILES et TOMASZ, 1970, in preparation), no association of LytA to TA supposedly present in the peripheral wall has been observed. This observation suggests that i) different TA species are present in the septal and the peripheral walls, ii) septal TA might be submitted to a modification/maturation process very soon after its synthesis (or translocation), hence impeding ever LytA recognition. The molecular determinants that make neo-synthesized TA specifically recognized by LytA remain to be deciphered. Whether this population is enriched in LTA or WTA or display particular degree of choline decoration are some of the many questions important to be addressed in the near future.

## Acknowledgments

This work used the platforms of the Grenoble Instruct centre (ISBG ; UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANRS-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). The electron microscopy facility is supported by the Rhône-Alpes Re-



gion, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), the fonds FEDER, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), the University of Grenoble Alpes (UGA), the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) and the GIS-Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBISA). J.B. received a PhD fellowship from the French Ministry of Education and Research. We thank Kousik Sundararajan for assistance with TEM (XX, Norway) and Yves Brun, Erkin Kuru and Michael van Nieuwenzhe (Bloomington University) for providing HADA.

## Troisième partie

### Conclusion et perspectives



La compréhension des mécanismes moléculaires de processus physiologiques et pathologiques sont des pré-requis essentiels dans le but de développer de nouvelles stratégies de prévention et/ou de traitements des infections bactériennes. La paroi bactérienne est une structure dynamique, essentielle à la survie de la bactérie et à la communication avec l'organisme hôte. Le PG et les TA sont les polysaccharides composants majeurs de la paroi des bactéries à Gram positif impliqués de façon cruciale dans la morphogénèse, la division et la pathogénèse. Du fait de l'importance de leur fonction et de leur origine spécifiquement bactérienne, ces polymères sont des cibles thérapeutiques privilégiées, comme en atteste depuis plus de 70 ans le succès des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines ciblant les PBPs, enzymes de synthèse du PG. Bien que le développement de molécules ciblant les TA soit beaucoup plus récent (PASQUINA et al., 2016 ; RICHTER et al., 2013), l'utilisation de ces nouvelles drogues anti-bactériennes, bien que ciblant uniquement les bactéries à Gram positif, parmi lesquels des pathogènes importants, pourrait permettre à moyen terme de réduire le problème de santé publique lié à la résistance aux antibiotiques actuellement sur le marché. Au cours de mon travail de thèse, j'ai étudié comment le PG et les TA participent de façon coopérative au remodelage de la paroi et de la division cellulaire chez *S. pneumoniae*.

## **Remodelage du PG par la régulation de l'activité d'hydrolases**

La rigidité du réseau macromoléculaire composé par le PG est requise pour contenir la pression osmotique interne et prévenir la lyse cellulaire. Cependant, la division cellulaire n'est envisageable que si l'extension du PG accompagne l'élongation et la septation des cellules, illustrant ainsi les propriétés dynamiques du maillage formé par le PG.

Différents mécanismes interviennent dans le remodelage structural que subit ainsi le PG. L'un d'eux repose sur l'activité d'enzymes hydrolases dont l'activité doit néanmoins être finement régulée pour prévenir une lyse accidentelle. La première publication, présentée au chapitre 5, révèle le rôle joué par Adr, la protéine responsable de la O-acétylation des résidus MurNAc des chaînes glycanes du PG (CRISOSTOMO et al., 2006), dans la régulation de l'activité de l'autolysine LytA et dans la synthèse du PG.

En accord avec des travaux précédents (TOMASZ et WAKS, 1975 ; MELLROTH et al., 2012), nous avons observé que LytA ne clive les liaisons de type amide du PG que lorsque la croissance des cellules est suspendue, c'est-à-dire lors de la phase stationnaire de croissance ou suite à l'inhibition des PBPs par la pénicilline. Les cellules en phase de croissance présentent donc une immunité face à l'activité lytique

de LytA. Dans ce travail, nous avons montré que la O-acétylation par Adr protège le PG des bactéries en phase exponentielle de croissance de l'activité hydrolytique de LytA.

Différents mécanismes moléculaires sous-jacents hypothétiques pourraient être impliqués. D'abord un effet direct dû à un encombrement stérique du groupement de O-acétylation qui empêcherait l'accès de LytA au site de clivage. Cependant cette hypothèse est peu probable car le groupement C6-OH des résidus MurNAc est exposé vers le solvant d'après la structure du site catalytique de LytA en complexe avec un pentasaccharide (SANDALOVA et al., 2016). L'autre hypothèse est un effet indirect de la O-acétylation sur la structure du PG dans lequel l'absence de O-acétylation conduirait à une la synthèse d'un PG non mature. Nos résultats suggèrent un effet sur la réticulation du PG. Si cette hypothèse est plausible, il devrait y avoir un effet de l'action de la pénicilline sur le niveau de O-acétylation. En effet, il a été observé chez *S. aureus* (SIDOW, JOHANSEN et LABISCHINSKI, 1990) et *Proteus mirabilis* (MARTIN et GMEINER, 1979) que la quantité de O-acétylation du PG est réduite en présence de pénicilline, et le même effet a été observé chez *N. gonorrhoeae* par l'inhibition de PBP2 (DOUGHERTY, 1983; DOUGHERTY, 1985). De plus, la pénicilline est un antibiotique bactériolytique qui induit la sensibilité des cellules à LytA chez *S. pneumoniae*. La sensibilité à LytA des bactéries en phase stationnaire et/ou lors de l'ajout de pénicilline, conduisant dans les deux cas à l'arrêt de la machinerie de synthèse du PG (TOMASZ et WAKS, 1975; CRISOSTOMO et al., 2006; MELLROTH et al., 2012), pourrait donc provenir d'une diminution ou d'un blocage de la O-acétylation du PG comme il l'a été observé chez d'autres bactéries.

La quantification du niveau de O-acétylation du PG s'avère très difficile à quantifier chez le pneumocoque (VOLLMER, 2008; CRISOSTOMO et al., 2006; BUI et al., 2012) et n'a pas pu être réalisée dans cette étude. Cependant, la localisation de Adr au site de division montre que la O-acétylation du PG a lieu lors de la synthèse du PG. La diminution ou l'arrêt de O-acétylation du PG en phase stationnaire ou lors de l'ajout de pénicilline est donc probablement restreinte à la région de néosynthèse de PG. Ainsi, la quantification de la O-acétylation du PG à partir d'un extrait total des bactéries ne permettrait pas de le détecter.

Enfin, la localisation d'Adr au site de division suggère aussi que cette modification intervient tôt dans la synthèse du PG et serait de ce fait reliée au fonctionnement de la machinerie de division et contribuerait ainsi à la synthèse d'un PG mature. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'un lien entre O-acétylation et l'activité transpeptidase des PBPs ciblée par la pénicilline (CRISOSTOMO et al., 2006; VOLLMER, 2008).

La suite de ce travail permettra de déterminer si le rôle d'Adr dans la synthèse de la paroi et la division implique son activité enzymatique et/ou des interactions moléculaires avec des protéines de la machinerie de division. Différentes approches sont susceptibles d'être employées pour identifier les partenaires d'Adr :

- Co-immunoprécipitation sur résine GFP-Trap en utilisant la protéine fusion Adr-sfGFP

- Co-immunoprécipitation en utilisant des anticorps ciblant des anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire ou les domaines membranaires de Adr par l'utilisation de l'outil BMW (publication présentée en annexe page 203).

- Double hybride bactérien

- Tests d'interaction *in vitro* avec des protéines recombinantes de la division (phase solide, Biacore, thermophorèse).

Des tests de mesure de l'activité enzymatique d'Adr ont été effectués *in vitro*. Le domaine catalytique a été produit et purifié au laboratoire et des résultats préliminaires prouvent que la protéine est capable d'utiliser une source d'acétate comme substrat. La seconde étape d'O-acétylation du PG reste à étudier.

Le groupe C6-OH des résidus MurNAc, outre la modification par O-acétylation, est également le site d'ancrage des WTA. Des études préliminaires semblent indiquer que la quantité de TA ne serait pas modifiée entre la souche sauvage et le mutant  $\Delta$ adr (données non montrées). La O-acétylation du PG ne régulerait donc pas l'ancrage des WTA à la surface de *S. pneumoniae*.

## Rôle des TA dans la régulation de l'hydrolyse du PG

Le rôle des TA dans le remodelage du PG a fait l'objet de la troisième publication présentée chapitre 8. Il est admis que les TA sont présents sur toute la surface bactérienne (BRILES et TOMASZ, 1970). Or, l'étude menée au laboratoire de la localisation de différentes CBPs recombinantes fusionnées à la GFP, ajoutées de façon exogène sur les bactéries, montrent qu'elles se localisent de manière différente à la surface bactérienne.

Par exemple, LytA, la CBP responsable de l'autolyse en phase stationnaire, aussi impliquée dans la lyse fratricide et la lyse induite par les antibiotiques comme la pénicilline (cf page 36), se localise au niveau du site de division, alors que LytB responsable de la séparation des cellules filles se localise aux pôles (cf page 46).

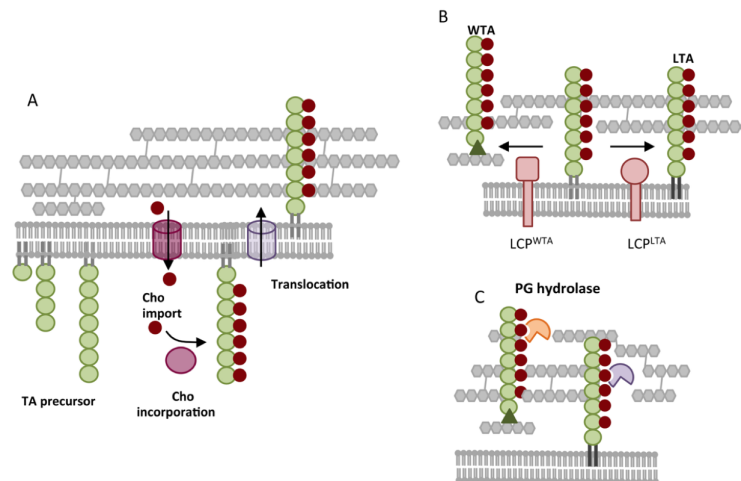
Un des déterminants de la localisation des CBPs est la propre localisation des TA. Nous avons montré dans la troisième publication que LytA se fixe sur une sous-population de TA correspondants aux TA néo-synthétisés marqués par chimie click.

Cette partie est discutée ci-dessous.

La localisation de LytA s'avère être uniquement dépendante de son CBD. L'étude des déterminants responsables de la localisation de différentes CBPs en fonction du CBD et de leur domaine fonctionnel pourra permettre de comprendre les mécanismes sous-jacents. En effet, toutes les CBPs possèdent un CBD dont la diversité dépend de la variabilité de la séquence des unités de répétition et du nombre de répétitions (hors séquence consensus des CBRs) (MAESTRO et SANZ, 2016). Ces différences pourraient induire des affinités différentes pour des sous-populations de TA donc influencer la localisation de la CBP.

D'autre part, en fonction des souches jusqu'à 16 CBPs se localisent à la surface bactérienne (FROLET et al., 2010) dont plusieurs ont des localisations similaires. Des résultats préliminaires ont montré qu'il existe aussi une compétition entre les CBPs pour la fixation sur une région précise. Les CBP ayant une affinité plus forte qu'une autre pourrait, par compétition, se localiser à la place d'une autre CBP contrainte de se fixer sur une région pour laquelle son affinité est moindre. La concentration de chaque CBPs devrait aussi jouer un rôle important dans cette compétition. L'affinité des CBPs pour une région spécifique de la surface bactérienne pourrait être mesurée par AFM (Atomic Force Microscopy). En effet, il est possible de décorer la pointe de la sonde avec des CBPs ou des sous-domaines recombinants, et de mesurer la force d'adhésion à la surface bactérienne. Cette technique a déjà été utilisée avec des lectines afin de mesurer les caractéristiques du PG et la distribution des TA chez d'autres bactéries (ANDRE et al., 2011 ; BEAUSSART et al., 2014) et des essais préliminaires sont en cours au laboratoire par Claire Durmort en collaboration avec Jean-Luc Pellequer de l'équipe AFM à l'IBS.

D'autre part, la répartition et/ou la concentration des LTA et WTA pourrai(en)t être hétérogène à la surface bactérienne. Les LTA, ancrés à la membrane, pourraient être moins accessibles depuis la surface bactérienne comparé aux WTA. Les CBP ayant un CBD plus long pourrait ainsi avoir accès plus facilement aux LTA que d'autres CBPs possédant un CBD plus court qui se fixeraient préférentiellement sur les WTA (Figure 8.14 page 199). Des résultats obtenus avec les techniques de marquage de chimie click de la publication chapitre 6 et du marquage avec le DIBO (chapitre 7) semblent montrer qu'il y aurait une concentration plus élevée de TA au niveau du site de division. Certaines CBPs comme LytA pourrait donc se localiser au niveau septal du fait d'une forte concentration en TA. De plus, LytA dimérise par l'extrémité des CBDs de chaque monomère pour former un dimère en forme de V. La conformation et l'espacement entre les deux CBD pourraient être importants pour la fixation correcte sur les TA. On peut imaginer qu'il soit nécessaire que les TA soit



**FIGURE 8.14 – Schéma de la synthèse des TA de *S. pneumoniae*.** **A.** Les précurseurs des TA sont synthétisés du côté cytoplasmique de la membrane. La choline exogène est importée dans le cytoplasme et intégrée dans les TA et les TA matures sont transloqués à la surface du pneumocoque. **B.** Les WTA et LTA sont respectivement ancrés sur le PG et la membrane par des protéines de la famille des LCP. **C.** Des hydrolases de la famille des CBP se fixent sur les TA et clivent le PG participant ainsi à son remodelage.

proches afin que les CBD de chaque monomère puisse se fixer sur les TA alors que des TA trop espacés dans des régions éloignées du site de division ne permettrait pas une fixation optimale de LytA.

## Etude de la voie de biosynthèse des TA et de la coordination avec la machinerie de synthèse du PG

L'étude des éventuelles différences de localisation et de répartitions des LTA et des WTA à la surface bactérienne s'avère difficile chez le pneumocoque avec la méthode chimie click développée, présentée chapitres 6 page 125 et 7 page 151, car les LTA et les WTA sont synthétisés par la même voie de biosynthèse et possèdent la même structure (Figure 8.14A/B page 199) ce qui n'est pas le cas chez les autres bactéries à Gram positif comme *B. subtilis* ou *S. aureus* pour lesquels il est possible de générer des mutants exprimant uniquement les LTA ou les WTA (D'ELIA et al., 2006a; D'ELIA et al., 2006b; GRÜNDLING et SCHNEEWIND, 2007; SCHIRNER et al., 2009; OKU et al., 2009). Cependant, différentes expériences pourraient amener des éléments de réponse.

La production de sacculi à partir de cellules ayant été cultivées avec la choline modifiée puis marquées par chimie click après purification des sacculi (les LTA sont solubilisés avec la membrane et éliminés lors de la purification), permettra de déterminer respectivement le site d'ancrage et la répartition des WTA sur le PG.



De même, la production de sphéroplastes à partir de cellules marquées permettra d'étudier la localisation des LTA, mais la morphologie bactérienne ne sera dans ce cas pas maintenue du fait de l'absence de PG. De plus, la membrane étant fluide la localisation des LTA sur des sphéroplastes ne sera peut-être pas représentative.

La ligase responsable de l'ancrage des LTA sur la membrane a récemment été identifiée par le laboratoire de Nicolas Gisch (Université de Borsel, Allemagne) (données non publiées). Si la souche délétée de cette protéine est viable ou si sa déplétion n'induit pas de problèmes morphologiques trop importants, l'étude du mutant pourrait permettre d'étudier s'il existe des différences de localisation entre les LTA et les WTA ainsi que leur rôle spécifique dans la localisation des CBPs à la surface bactérienne mais aussi dans la morphogenèse et la division.

En effet, la méthode de marquage des TA *in vivo* par chimie click ouvre le champ à l'étude de la machinerie de synthèse des TA. L'étude de mutants déplétés pour des protéines impliquées dans la synthèse des TA pourra permettre d'aider à caractériser et comprendre le rôle précis de ces protéines par l'étude phénotypique des souches, l'analyse RMN (résonance magnétique nucléaire) de la composition des TA et leur localisation à la surface bactérienne par l'utilisation de la méthode de chimie click.

La localisation des TA *in vivo* a aussi permis l'étude la coordination des machineries de biosynthèse des TA et du PG. Le chapitre 7 page 151 montre que les synthèses colocalisent au niveau du site de division, mais qu'il existerait une différence de synchronisation, la synthèse des TA se terminant après la synthèse du PG au site de division parental. Les acteurs de la coordination et la co-régulation de ces deux machineries de synthèse restent à identifier. Afin de répondre à cette question, l'étude de la localisation de leur synthèse dans différents mutants de protéines impliquées dans la division ou la synthèse des TA est actuellement en cours.

# Quatrième partie

## Annexes



# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Autocatalytic association of proteins by covalent bond formation: a Bio Molecular Welding toolbox derived from a bacterial adhesin

Received: 06 October 2016

Accepted: 25 January 2017

Published: 02 March 2017

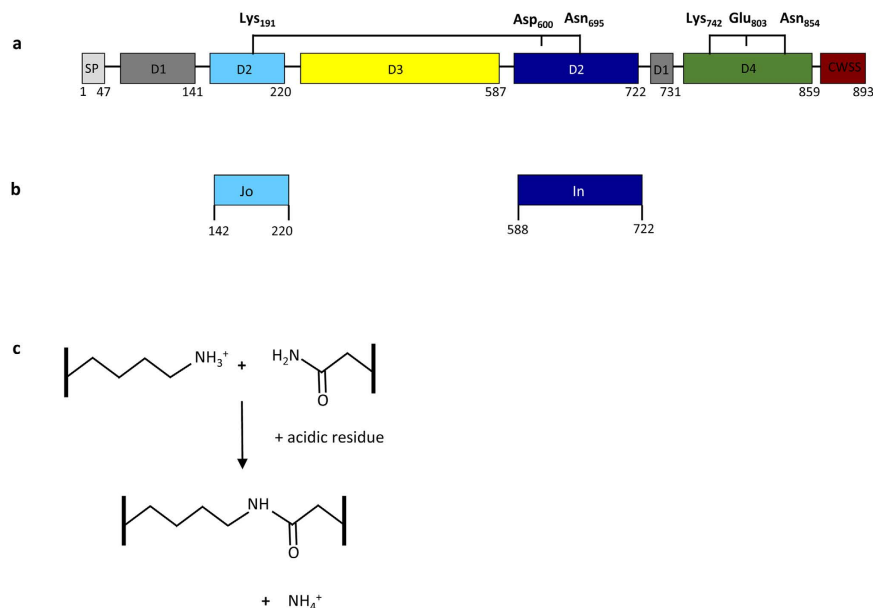
J. Bonnet<sup>1</sup>, J. Cartannaz<sup>1</sup>, G. Tourcier<sup>2</sup>, C. Contreras-Martel<sup>1</sup>, J. P. Kleman<sup>1</sup>, C. Morlot<sup>1</sup>, T. Vernet<sup>1</sup> & A. M. Di Guilmi<sup>1</sup>

Unusual intramolecular cross-links present in adhesins from Gram-positive bacteria have been used to develop a generic process amenable to biotechnology applications. Based on the crystal structure of RrgA, the *Streptococcus pneumoniae* pilus adhesin, we provide evidence that two engineered protein fragments retain their ability to associate covalently with high specificity, *in vivo* and *in vitro*, once isolated from the parent protein. We determined the optimal conditions for the assembly of the complex and we solved its crystal structure at 2 Å. Furthermore, we demonstrate biotechnological applications related to antibody production, nanoassembly and cell-surface labeling based on this process we named Bio Molecular Welding.

Cross-linking of amino acid side chains is an efficient way to promote protein folding and stabilization at the post-translational level. The most common feature is the formation of intra- or intermolecular disulfide bonds to stabilize tertiary and quaternary structures, respectively. One prominent example is given by antibody molecules, whose disulfide-bond mediated stability in blood circulation is crucial for efficient function. Interactions of Gram-positive bacteria with host organisms are resolved by adhesins like pilins and MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) in which unusual intramolecular cross-links have been recently discovered<sup>1–3</sup>. As adhesins are surface-exposed proteins, they must resist various antibacterial defense mechanisms like degradation by enzymes (proteases, peroxidases) or unfolding upon pH changes. The covalent linkages present in adhesins enhance their thermal stability and resistance to proteases degradation, thus stabilizing their tertiary structure<sup>4–8</sup>. In the case of pili, the presence of these isopeptide bonds, together with the fact that pilins are covalently linked to each other, make Gram-positive pili highly resistant to mechanical stress and degradation<sup>9</sup>.

Pilins and MSCRAMMs share a common topology: a N-terminal signal peptide followed by extracellular domain(s), a cell wall sorting motif (Leu-Pro-x-Thr-Gly or a variant) recognized by sortases which covalently anchor proteins to peptidoglycan, a transmembrane helix and a short cytoplasmic sequence. Most pilins and MSCRAMMs have an elongated shape formed by the association of domains, which resemble Ig-like  $\beta$ -sandwich domains<sup>2</sup>. Intramolecular isopeptide bonds are mostly formed between the side chains of Lys and Asn, although Lys-Asp bonds also exist<sup>5,10</sup>. These residues are positioned in a hydrophobic core in which the pKa of the Lys is reduced, allowing nucleophilic attack of the C $\delta$  atom of either Asn or Asp, followed by a proton shuttle involving an adjacent Glu or Asp<sup>5,10,11</sup>. Although not involved in protein stabilization, thioester bonds established between Cys and Gln residues have also been described<sup>5</sup>. The last intramolecular bond reported is an ester bond formed between a Thr and a Gln side chain in a putative *Clostridium perfringens* MSCRAMMs, through an autocatalytic mechanism that differs from that of Lys-Asn/Asp bonds<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Institut de Biologie Structurale (IBS), Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, 38044 Grenoble, France. <sup>2</sup>Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble (BIG), Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, 38044 Grenoble, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.V. (email: thierry.vernet@ibs.fr) or A.M.D.G. (email: anne-marie.di-guilmi@ibs.fr)



**Figure 1. Intramolecular isopeptide bonds in RrgA domains.** (a) Schematic topology of RrgA composed of four domains (D1 to D4) in addition to the peptide signal (SP) and the cell wall sorting signal (CWSS). D3 is inserted into D2, and D2/D3 are inserted into D1. D2 and D4 are stabilized by intramolecular isopeptide bonds figured by brackets. In D2, the isopeptide bond between the side chains of Lys<sub>191</sub> and Asn<sub>695</sub> is stabilized by Asp<sub>600</sub>. The isopeptide bond in D4 between Lys<sub>742</sub> and Asn<sub>854</sub> is stabilized by Glu<sub>803</sub>. D2 is formed by the association of two distinct regions, hereafter called Jo and In, held together by the isopeptide bond. (b) Jo and In constructs. (c) The amide bond formation between Lys and Asn side chains depends on an acidic residue, either Glu or Asp.

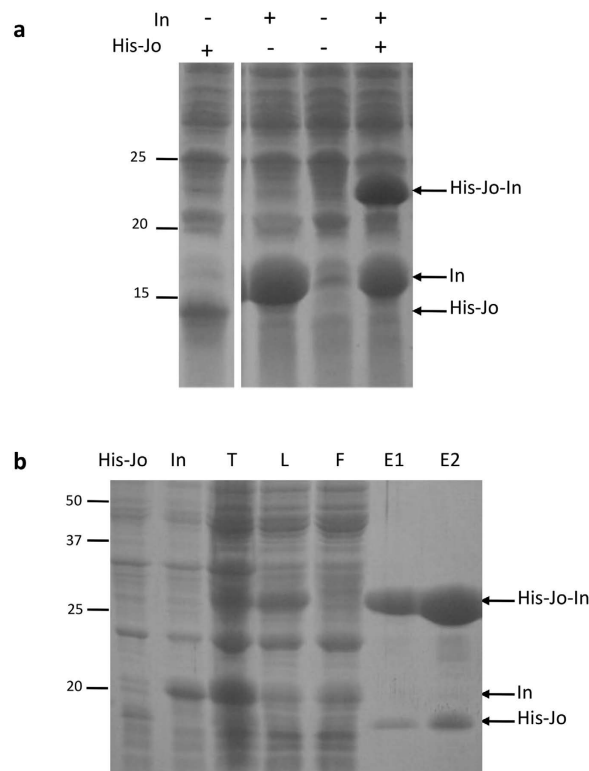
Intramolecular isopeptide cross-linking is autocatalytic. Indeed, there is neither need for a chaperone-assisted machinery like for disulfide bond formation, nor assistance by dedicated enzymes like transglutaminase, ubiquitinase or sortase. In addition, no specific oxido-reduction environment is required. These attractive features have been exploited in biotechnology through the development of peptide tags<sup>12,13</sup>. This pioneering strategy developed by the Howarth's group consists in splitting a pilin into two separate protein-peptide pairs and reconstituting specifically the globular domain through the covalent association between the two partners. This protein-peptide tag system has been fused to various proteins-of-interest for several applications, including polymerization of linear, branched or combinatorial polyproteins via iterative sequential reactions on solid-phase<sup>14</sup>, design of new protein architectures<sup>15</sup>, protein cyclization to resist unfolding<sup>16</sup> and vaccination<sup>17</sup>.

Based on the crystal structure of RrgA, the pilus adhesin from *Streptococcus pneumoniae*, we exploited a unique protein-protein fusion system. We provide evidence that two engineered protein fragments from RrgA retain their ability to associate covalently *in vivo* and *in vitro* although being isolated from the parent protein. We report the biochemical and structural characterization of the complex assembly and validate several biotechnological applications based on this process, that we called Bio Molecular Welding (BMW).

## Results and Discussion

**Covalent and spontaneous association between Jo and In partners.** RrgA is the structural pilin positioned at the tip of *S. pneumoniae* pilus-1 and contains four unusual elongated domains<sup>8</sup>. Domains D1 and D2 carry secondary structure elements, from both the N-terminal and C-terminal RrgA regions, into which other sequences have been inserted (domain D3 is inserted into D2; D2/D3 are inserted into D1) (Fig. 1a). RrgA harbors two intramolecular isopeptide bonds, one located in the D2 domain, and the second in D4. The D4 domain (Fig. 1a) precedes the C-terminal CWSS sorting motif and its fold is highly reminiscent of IgG domains. The isopeptide bond stabilizing the D4 domain is formed by Lys<sub>742</sub> and Asn<sub>854</sub>, the hydrogen bonding stabilization being provided by Glu<sub>803</sub><sup>8</sup>. The D2 domain is formed by the association of 2 “halves” encoded by sequences flanking the D3 domain (Fig. 1a). The distinct N-(residues 144–220) and C-terminal (residues 593–722) sub-domains, hereafter referred as Jo and In, respectively (Fig. 1b), clasp into an 11- $\beta$  stranded sandwich locked by an isopeptide bond between the side chains of Lys<sub>191</sub> in Jo and Asn<sub>695</sub> in In (Fig. 1a)<sup>8</sup>. The amide bond formation between the Lys and the Asn side chains is dependent on Asp<sub>600</sub><sup>8</sup> (Fig. 1c).

To test whether Jo and In sub-domains retain their ability to covalently interact and reconstitute the RrgA D2 domain, DNA sequences encoding His-Jo and In were cloned into pETDuet plasmid under the control of a T7 promoter for co-expression in *Escherichia coli* cytoplasm (Fig. 2a and S1). We did not notice any effect of the properties of the *E. coli* cultures, such as optical density, on the level of Jo and In association. As observed in crude *E. coli* lysates when expressed individually, His-Jo and In sub-domains are produced as soluble proteins and the molecular masses observed by SDS-PAGE are consistent with the calculated molecular mass values: 10 470 Da and 15 091 Da, respectively (Fig. 2a). Co-expression of His-Jo and In was induced with IPTG for 3 h at 37 °C, a



**Figure 2. Jo and In covalently associate in bacterial crude extracts.** (a) Crude extracts from *E. coli* cells expressing His-Jo and/or In proteins. Co-expression of His-Jo and In leads to the formation of the covalent His-Jo-In complex. (b) Reconstitution of the covalent His-Jo-In complex by mixing separate *E. coli* cultures expressing either His-Jo or In. The His-Jo-In complex was purified by Ni-affinity chromatography. His-Jo and In: total cell extract of separated cultures, T: total cell extract of mixed cultures, L: load, F: flow through, E1 and E2: elution fractions containing the His-Jo-In complex. The polyacrylamide gels were run in denaturing conditions (SDS-PAGE) and stained by Coomassie blue. The molecular mass standards (in kDa) are indicated on the left.

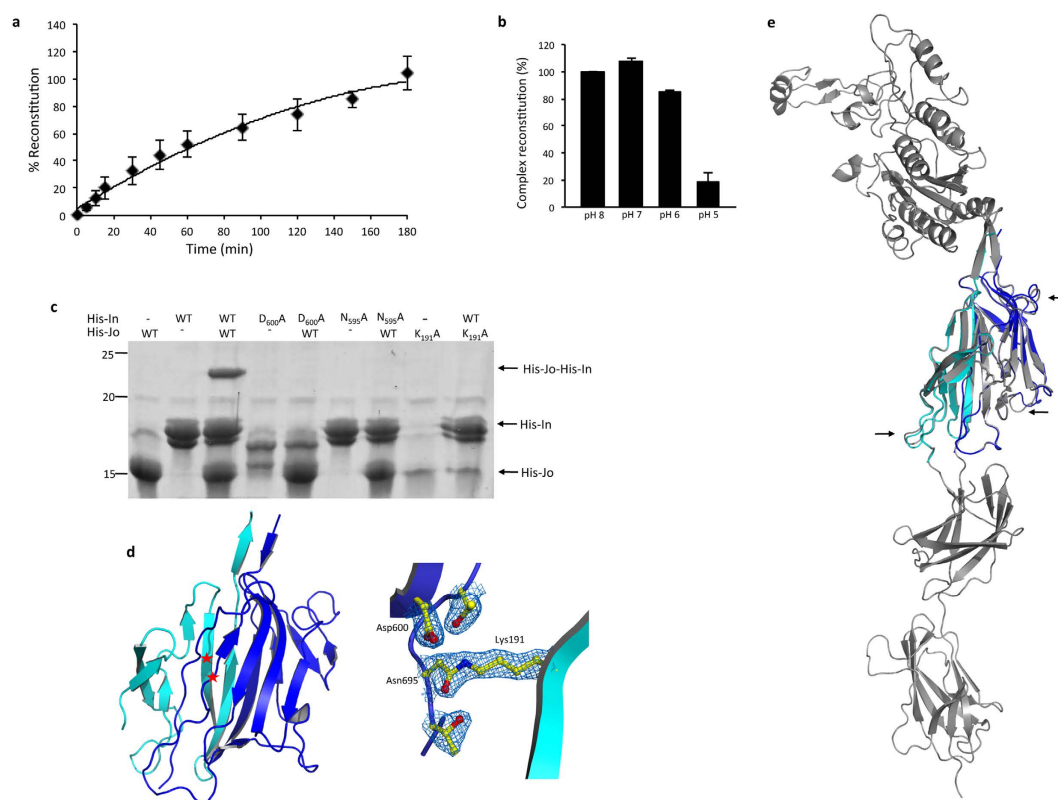
period long enough to allow Jo and In association. Indeed, when His-Jo and In were co-expressed, an additional species migrating at about 22 kDa is observed, indicating that the covalent complex between His-Jo and In has formed with the expected 1:1 stoichiometry although free In is still detected, likely due to overexpression of In over His-Jo (Fig. 2a). Observation of the recombinant His-Jo-In complex in *E. coli* cell extracts provides the first evidence that isolated Jo and In sub-domains are able to covalently associate with high efficiency and specificity in the crowded molecular environment of bacterial cytoplasm.

We next tested whether His-Jo and In, produced separately, would associate *in vitro*. Cultures expressing either His-Jo or In were mixed after the induction period and before sonication. The total contact time, starting when cultures were mixed and ending when the complex was eluted from the affinity resin is about 1 h, and the whole experiment was carried out at 20 °C (Fig. 2b). The covalent His-Jo-In complex was observed in the crude cell extract and in the soluble fraction after centrifugation, indicating that the Jo-In association can happen after complete synthesis of the polypeptide chains (Fig. 2b, lanes T and L). The complex His-Jo-In was efficiently purified by Ni-affinity chromatography (Fig. 2b, lanes E1 and E2). Small quantities of His-Jo were also eluted from the Ni-column, either because an excess of His-Jo was produced over In or owing to a fraction of His-Jo unable to associate to In. Altogether, these data show that Jo and In sub-domains retain their ability to form a stable complex although isolated from the parent RrgA protein.

**Characterization of the Jo-In complex formation.** To characterize *in vitro* conditions the covalent association of Jo and In proteins, the complex was reconstituted from independently purified His-Jo and His-In proteins and its assembly was monitored over time (see Methods). The complex was detected upon 5 min of incubation, about 60% of the complex was reconstituted after 90 min and about 100% after 180 min (Fig. 3a).

The presence of a negatively charged residue (Asp<sub>600</sub>) in the vicinity of residues involved in the isopeptide bond led us to test the influence of the pH in the autocatalytic reaction. The reaction was efficient at pH 8 and pH 7 since 100% of the complex was reconstituted after 1 h, the formation of the complex was slightly reduced to 90% at pH 6 and largely inefficient at pH 5 since only 18% of the complex could be detected (Fig. 3b). This pH dependency suggests that a residue, likely Asp<sub>600</sub>, with a pKa value between 5 and 6 might need to be deprotonated to participate in the reaction mechanism.

The covalent association of Jo and In was confirmed by measuring the molecular mass of the complex by electro-spray ionization mass spectrometry (ESI-MS) as reported previously<sup>7</sup>. The measured molecular mass of



**Figure 3. Characterization of the Jo-In complex.** (a) Kinetics of complex formation. A quantity of 10  $\mu$ M of purified His-Jo and His-In were mixed and incubated at 20  $^{\circ}$ C for different durations before analysis by Coomassie blue-stained SDS-PAGE. The amount of His-Jo and His-Jo-His-In complex in the mix was quantified using ImageJ and the calculated proportion of the complex (ratio complex: Jo) was plotted against time (min) (see Methods). Error bars represent standard deviation of three independent experiments. (b) pH dependency of complex formation. Jo and In partners were mixed at 25  $\mu$ M in buffered solutions at pH 5 to 8 and incubated at 20  $^{\circ}$ C for 60 min. The proportion of the complex was calculated, reported for each pH value and normalized to 100%. Error bars represent standard deviation of two independent experiments. (c) The covalent complex is observed in the presence of the wild-type (WT) proteins and is impaired by Lys<sub>191</sub>Ala, Asn<sub>695</sub>Ala and Asp<sub>600</sub>Ala mutations. For clarity reason, the one-letter amino acid code is figured. Wild-type and mutant forms of purified His-Jo and His-In were incubated for 30 min at 20  $^{\circ}$ C. The samples were analyzed by Coomassie blue-stained gels. (d) Ribbon representation of the His-Jo-In complex (left panel). Jo is colored in cyan and In in blue. Red asterisks indicates the position of Lys<sub>191</sub> in Jo and Asn<sub>695</sub> in In proteins. Right panel: close-up view of the key residues for the amide bond formation (represented in sticks), the electron density is also shown. (e) Crystal structure of the Jo-In complex (cyan and blue, respectively) superimposed on the D2 domain (grey) in the context of the full-length RrgA protein (PDB ID: 1WW8). Arrows indicate minor differences in the structures superposition.

26 772 Da is in accordance with the predicted mass assuming the formation of the isopeptide bond, which results in the loss of a NH<sub>3</sub> group of 17 Da (Table 1)<sup>8</sup>.

To further demonstrate that Jo and In reconstitute the RrgA D2 domain in a spontaneous and covalent manner, the residues involved in the isopeptide bond, Lys<sub>191</sub>, Asp<sub>600</sub> and Asn<sub>695</sub> were individually mutated into Ala<sup>8</sup> and the formation of the complex was tested. Wild-type (WT) and variants of Jo and In were purified independently and mixed in different combinations (Fig. 3c). The covalent complex His-Jo-His-In was formed only when both WT forms of Jo and In were mixed, while each point mutation totally impaired the complex assembly (Fig. 3c).

The rather slow kinetics of the Jo-In complex formation might originate from an alteration of the structure of the protein fragments when isolated from the parent RrgA protein. In this case, one might expect the His-Jo-In complex to display a structure slightly different from the D2 domain of RrgA. To test this possibility, we have solved and refined the crystal structure of the His-Jo-In complex (PDB: 5MKC) at 2.04  $\text{Å}$  (Table 2). The structure of the complex shows that the Jo and In moieties grasp into an 11- $\beta$ -stranded sandwich (Fig. 3d). The two partners are locked together by the isopeptide bond formed by the fusion of the side chains of Lys<sub>191</sub> and Asn<sub>695</sub> in proximity to Asp<sub>600</sub> (Fig. 3d). The structure of the complex is indistinguishable from that of the RrgA D2 domain (rms of 0.61  $\text{Å}$ ), indicating that the fold adopted by the Jo and In partners produced individually, although possibly different from that acquired in the context of the full RrgA sequence, still remains compatible with the complex formation (Fig. 3e). Parental RrgA and Jo-In complex structures were superimposed and neither significant

	$M_{\text{average}}^{\text{a}}$ (Da)		$\Delta (M_{\text{expected}} - M_{\text{observed}})^{\text{b}}$ (Da)	NH <sub>3</sub> units lost
	Expected <sup>b</sup>	Observed by ESI-TOF		
His-Jo	10 470	10 471	0	0
His-In	16 318	16 319	0	0
His-Jo. His-In	26 770	26 772	18	1
His-Jo <sub>K191A</sub>	10 413	10 413	0	0
His-In <sub>D600A</sub>	16 274	16 274	0	0
His-In <sub>N695A</sub>	16 275	16 275	0	0
His-Jo-GSTPGSV-In	25 874	25 857	17	1

**Table 1. Molecular masses of Jo and In partners determined by ESI-MS.** <sup>a</sup>Average molecular mass. <sup>b</sup>The values of the expected masses take into account the formation of the isopeptide bond.

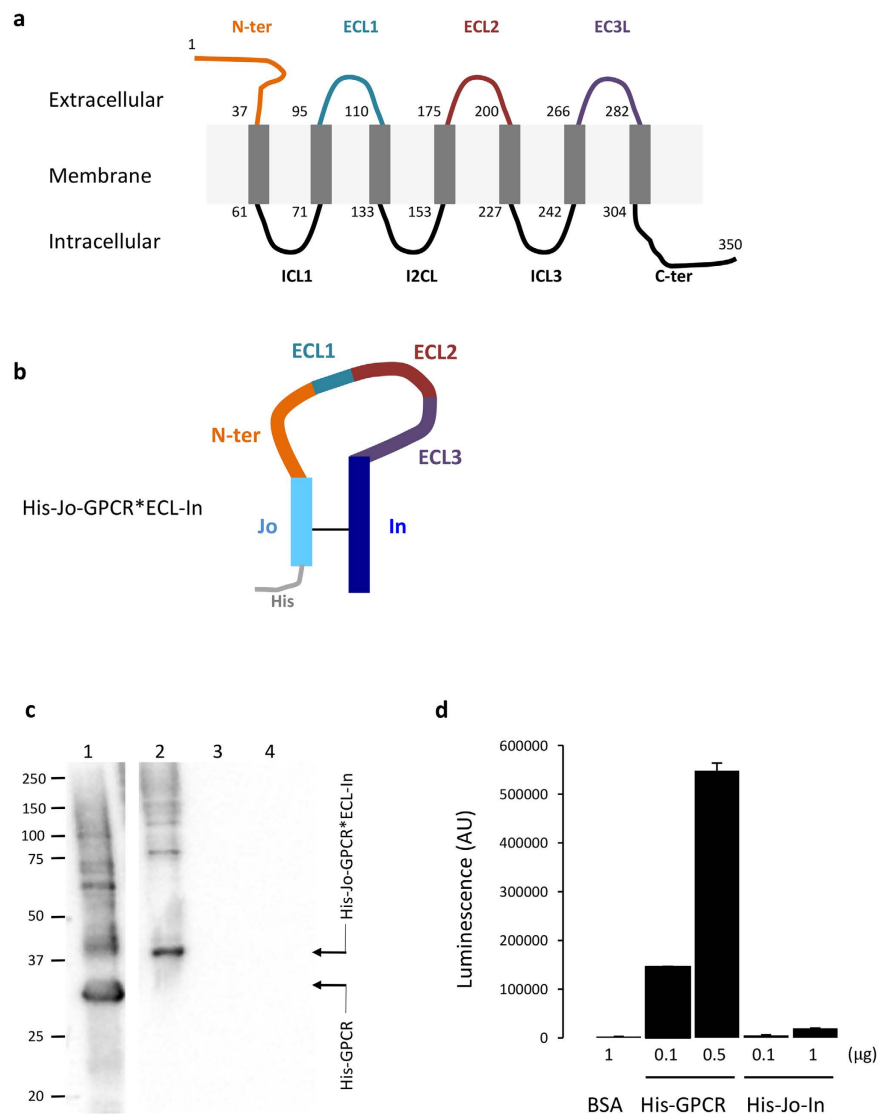
DATA COLLECTION	
X-ray source	ID23EH2
Detector	MarMosaic 225
Wavelength (Å)	0.87260
Scan-range (°)	150
Oscillation (°)	1
Space group	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<i>a</i> (Å)	132.54
<i>b</i> (Å)	134.57
<i>c</i> (Å)	144.47
Mosaicity (°)	0.214
Overall resolution (Å)	45.91–2.04
No. observed/unique reflections	689197/153725
High resolution shell (Å)	2.17–2.04
Completeness (%) (last shell)	93.6 (83.8)
<i>R</i> <sub>sym</sub> (last shell)	4.6 (54.9)
<i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> ) (last shell)	30.60 (3.02)
Wilson plot B-factor (Å <sup>2</sup> )	41.71
MOLECULAR REPLACEMENT	
Solvent content (%)	40
Mol/ASU	6
Phaser RZF/TZF scores	8/26, 9/50, 8/60, 7/72, 8/68, 10/79
Phaser LLG scores	481, 1837, 3768, 6450, 9539, 13378, 15960
REFINEMENT	
Initial <i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)	27.44/31.56
Final <i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)	21.32/24.31
RMS deviation, bond lengths (Å)	0.009
RMS deviation, bond angles (°)	1.266
Mean B-factor (Å <sup>2</sup> )	53.73
No. of protein atoms	10949
No. of water molecules	1023
No. of sulfate molecules	15
No. of ions (Ni, Ca)	3, 3
Residues in most favored/allowed region of Ramachandran plot (%)	100.0

**Table 2. Data collection, molecular replacement and structure refinement statistics.**

differences nor flexibility were detected despite slight variations observed in a few loops (depicted in Fig. 3e by arrows).

**Application 1 of the BMW<sup>JOIN</sup> process: antigen display.** The BMW<sup>JOIN</sup> platform has the following attractive features: (1), His-Jo-In is expressed in *E. coli* to high levels (about 10 mg/L culture); (2), the complex is highly soluble; (3), fusion of the Jo and In halves into a single polypeptide chain should result in the production





**Figure 4. The BMW<sup>JOIN</sup> toolbox can be used for presentation of protein loops and antibody production.** (a) Topology of the membrane protein used in this study, a GPCR with seven transmembrane helices. ECL: extracellular loop, ICL: intracellular loop. The residues delimiting each transmembrane helix (grey rectangles) are indicated. (b) Concatenation of the extracellular regions of the GPCR (G-protein coupled receptor) and fusion to Jo and In. The so-called purified His-Jo-GPCR\*ECL-In (\*refers to the soluble regions of the GPCR protein) was used to immunize rabbits. (c) Western Blot performed with anti-GPCR\*ECL purified antibodies. 1: His-GPCR; 2: His-Jo-GPCR\*ECL-In; 3: His-Jo-In; 4: Hla-His (hemolysin alpha of 35 kDa used as a negative control). The molecular mass standards (kDa) are indicated on the left. (d) ELISA assay performed with anti-GPCR\*ECL purified antibodies. Coated quantities of His-GPCR, His-Jo-In and BSA are indicated. Error bars represent standard deviation of duplicates and the results shown are representative of two independent experiments.

of a circular protein upon formation of the isopeptide bond, which might display a potentially enhanced stability as previously shown<sup>16</sup>. To test this latter possibility, Jo and In were joined together with an intervening 7-residue peptide linker and this construct was expressed at high level in *E. coli* (about 15 mg/L culture). The purified product, His-Jo-GSTPGSV-In, folds into a circular single polypeptide chain containing the covalent isopeptide bond as confirmed by ESI-MS (Table 1). The fact that the Jo-In association was not impaired by the presence of a heterologous peptide prompted us to exploit this property as a platform to expose otherwise unstable protein sequences. As a first application, we employed this tool to produce protein fragments to be used as antigens for the production of antibodies against difficult-to-express proteins, in particular transmembrane helices. We selected a membrane protein from the GPCR (G-protein coupled receptor) family displaying 7 transmembrane anchors, 3 intracellular and 3 extracellular loops; the N- and C-terminal tails being exposed extracellularly and intracellularly, respectively (Fig. 4a). The sequences coding for all the extracellular regions were fused in an artificial sequence and inserted between Jo and In, leading to a His-Jo-GPCR\*ECL-In construct (Fig. 4b).

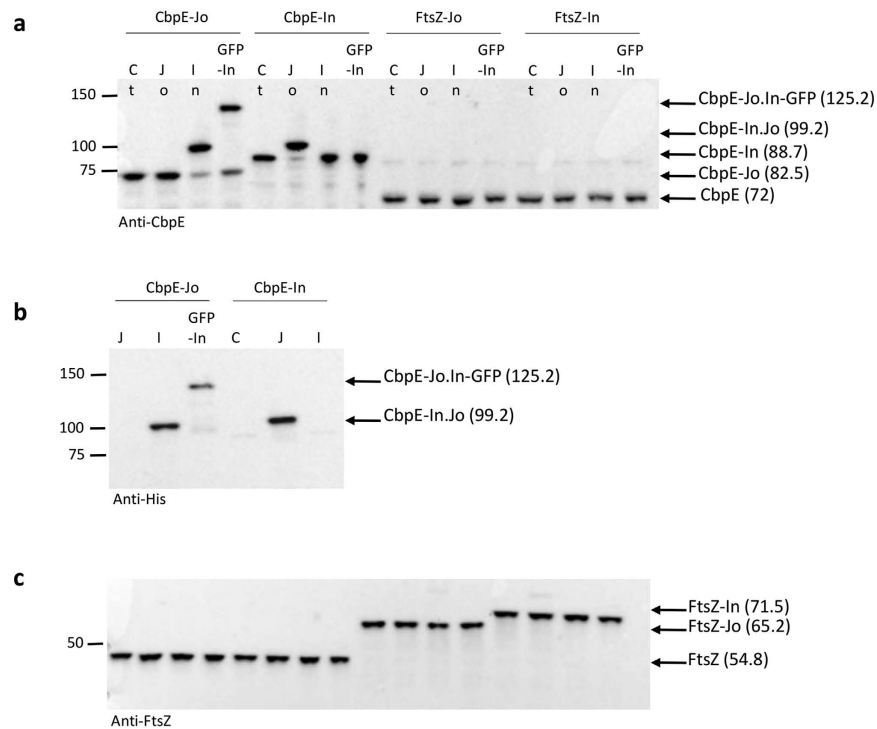


**Figure 5. Supra-molecular assembly of BMW<sup>JOIN</sup>-fusion proteins.** (a) Topology of CbdE constructs fused to Jo and/or In in various configurations. The masses of the purified proteins, measured by ESI-MS, are indicated on the right. (b) A covalent complex is formed between His-Jo-CbdE and His-In-CbdE (indicated by a star). His-Jo-CbdE-Jo appears as a single species while His-Jo-CbdE-In generates a wide range of high-molecular species. The assay used purified His-Jo-CbdE, His-Jo-CbdE-Jo and His-Jo-CbdE-In and a total cell extract for His-In-CbdE to test the specificity of the interaction.

Rabbit polyclonal serum was generated against the His-Jo-GPCR\* ECL-In (His-Jo-G-protein coupled receptor\* extracellular-In) purified circular protein. Immuno-purifications of sera were performed in order to remove antibodies against His-tag, Jo and In proteins. A first purification step using a His-Jo-In-coupled resin efficiently removed anti-His-Jo-In IgG present in the serum. Indeed, the immuno-purified antibodies did not recognize neither the His-Jo-In complex nor the His-tagged hemolysin alpha (Hla-His) protein used as a control (Fig. 4c, lanes 3 and 4) but they allowed efficient detection of the His-Jo-GPCR\* ECL-In construct, the migration of which is in accordance with the expected 33 238.90 Da molecular mass (Fig. 4c, lane 2). More interestingly, they also enabled efficient detection of a full-length His-GPCR construct produced in a cell-free system (Fig. 4c, lane 1). The His-GPCR protein migrates at about 30 kDa, a value that is lower than the calculated mass of 41 928.30 Da. Such discrepancy in electrophoretic migration is often observed in multi-membrane proteins due to detergent binding<sup>18</sup>. The upper bands likely correspond to non-covalent multimerized forms of the protein (Fig. 4c, lane 1). The data obtained by Western blot were further supported by ELISA assay using the purified serum (Fig. 4d). In this assay, a negligible luminescence signal was obtained when the purified serum was incubated with the His-Jo-In complex while dose-dependent signal was detected when the purified serum was incubated with the full-length His-GPCR construct.

In conclusion, our procedure, that we called Loop-Of-Loops (LOL), provides a fast and inexpensive way to deliver ELISA and Western blot-compatible rabbit polyclonal antibodies derived from the exposed regions of membrane proteins without the need to produce and purify the full-size parent protein or to synthesize expensive and often poorly antigenic peptides. Five different projects were set up with the same procedure: antibodies against two other GPCRs as well as a potassium channel were successful in delivering antibodies. Only one failed.

**Application 2 of the BMW<sup>JOIN</sup> process: large molecular assemblies.** Veggiani *et al.*<sup>14</sup> have reported a system derived from the D4 Ig-like domain of *S. pneumoniae* RrgA for the programmable and efficient construction of polyproteins. These artificial structures can have various architectures not restricted to linear forms but also allowing for the design and synthesis of branched and combinatorial proteins. We have explored the possibility to use the BMW process (derived from the non Ig-like D2 domain of *S. pneumoniae* RrgA) to construct large molecular protein assemblies. The circularization of Jo and In expressed as a single polypeptide chain while separated by a flexible linker is a first step toward using the BMW<sup>JOIN</sup> platform for the production of novel structures. The insertion between Jo and In of sequences of various sizes and properties might allow the production of reagents able to autoassemble in a controlled fashion. To explore this possibility, we have selected Choline-Binding Domain E (CbdE), a 292 residues-long protein of moderate flexibility<sup>19</sup> from *S. pneumoniae*. This surface-exposed protein, containing a repetition of 10 modules was used as a spacer between Jo and In (Fig. 5a). All constructs were His-tagged and purified by Ni-affinity chromatography prior to *in vitro* mixing. SDS-PAGE migration patterns and ESI-MS measurements indicated that His-Jo-CbdE, His-In-CbdE and His-Jo-CbdE-Jo remain monomeric (Fig. 5a and b). Co-expression of His-Jo-CbdE with His-In-CbdE led to the production of both monomeric proteins together with a species with molecular mass determined by ESI-MS which corresponds to the isopeptide bond-linked complex (Fig. 5a and b). The expression of His-Jo-CbdE-In resulted in the formation of various



**Figure 6.** The BMW<sup>JOIN</sup> toolbox can be used for detection of surface-exposed proteins. (a) Immunoblots analysis of whole cell lysates from unencapsulated pneumococcal cells expressing CbpE-Jo, CbpE-In, FtsZ-Jo and FtsZ-In and incubated with PBS (Ct), His-Jo (Jo), His-In (In) or His-GFP-In (GFP-In) with anti-CbpE serum. (b) Immunoblots analysis of samples shown in (A) with anti-His-tag. (c) Immunoblots analysis of samples shown in (A) with anti-FtsZ serum. The CbpE and FtsZ variants and their calculated molecular masses (kDa) are indicated on the right side of the panels and the molecular masses standards (kDa) are marked on the left.

combinations of Jo-In complexes (Fig. 5b). When CbpE was fused to both Jo and In proteins, a variety of Jo and In associations occurred *in vivo* leading to different species of high molecular weight as observed after protein purification (Fig. 5b last lane). In addition, a monomeric form of His-Jo-CbpE-In of 60 135 Da was detected by ESI-MS in which Jo and In were linked through the isopeptide bond, leading to a circular molecule as depicted in Fig. 5a.

These data indicate that stable high molecular structures can be obtained from the insertion of a large protein sequence fused in between Jo and In. Further work is in progress to control the design and production of new BMW-derived network of proteins to tailor large protein assemblies that would complete the tools developed from the Ig-like D4 domain<sup>14</sup>.

**Application 3 of the BMW<sup>JOIN</sup> process: detection of cell surface-exposed proteins.** The presence of proteins exposed at the cell surface is usually performed by immunodetection after subcellular fractionation or limited proteolytic cleavage and alternatively by an *in vivo* approach related to the measurement of the extracellular activity of an enzyme (alkaline phosphatase,  $\beta$ -lactamase) fused to the protein of interest. Altogether, these techniques are time-consuming, subject to contaminations and to artefacts. In this work, we tested whether the BMW<sup>JOIN</sup> tool would be more efficient to address these issues. The Choline-binding-protein (CbpE) from *S. pneumoniae* was chosen as a model of secreted protein associated to the bacterial cell wall. CbpE contains a signal peptide, a N-terminal phosphorylcholine esterase catalytic domain, followed by the CbdE region interacting non-covalently with choline residues decorating the teichoic acids in *S. pneumoniae*.

The 3' end of the *cbpE* gene was fused to the sequences encoding either Jo or In, or FtsZ, a cytoplasmic protein used as a negative control in the unencapsulated pneumococcal strain R800. We first tested whether Jo and In could recognize and associate to their partners when they were fused to CbpE. Pneumococcal cultures expressing the various fusion proteins were harvested at exponential growth phase, washed and incubated with purified His-Jo, His-In or His-GFP-In proteins for 1 h at 20 °C (GFP accounts for Green Fluorescent Protein). Cells were washed and comparable amounts of material were loaded on SDS-PAGE for immunodetection using anti-CbpE or anti-His antibodies. Protein species with apparent molecular masses of about 100 kDa were detected when cells that express CbpE-Jo (82.5 kDa) or CbpE-In (88.7 kDa) were incubated with His-In and His-Jo, respectively (Fig. 6a and b). In a similar way, incubation of His-GFP-In with cells expressing CbpE-Jo led to the formation of a protein species migrating just below the 150 kDa molecular mass marker. The about 100 kDa species likely correspond to the CbpE-Jo-In complex (theoretical molecular mass of 99.2 kDa) while the < 150 kDa species is consistent with the CbpE-Jo-In-GFP complex (theoretical molecular mass of 125.2 kDa) (Fig. 6a and b). The resistance of these large protein species to SDS-PAGE denaturing conditions indicates that they result from the

covalent association of the Jo and In partners. Neither incubation of the cells with buffer nor with the same BMW<sup>JOIN</sup> partner (*i.e.* CbpE-Jo plus His-Jo or CbpE-In plus His-In) led to a mass shift, confirming the specificity of the Jo-In interaction.

To verify that cytoplasmic proteins were not accessible to exogenously added Jo and In proteins, similar experiments were performed with cells expressing Jo and In fusions to the cytoplasmic division protein FtsZ. The apparent masses of the different variants of FtsZ are in accordance with the expected values: FtsZ (54.8 kDa), FtsZ-Jo (65.2 kDa) and FtsZ-In (71.5 kDa) (Fig. 6c). No mass increase of FtsZ was observed whatever the BMW<sup>JOIN</sup> combination tested, demonstrating that the exogenous BMW<sup>JOIN</sup> proteins do not penetrate into the cytoplasm to reach FtsZ-BMW<sup>JOIN</sup> proteins (Fig. 6c). These results indicate that only proteins exposed at the cell surface and bearing one BMW<sup>JOIN</sup> partner are accessible to the complementary ligand.

In conclusion, this method aimed to detect proteins exposed at the cell surface based on the Jo-In association is rapid, little sample processing is required since whole live cells are used. Altogether, these results open the way to exploit the BMW<sup>JOIN</sup> toolbox to detect proteins exposed at the bacterial cell surface, even in the absence of specific antibody. Work is in progress to apply this tool to Gram-negative bacteria.

**Application 4 of the BMW<sup>JOIN</sup> process: localization of proteins exposed at the surface of live cells.** Labeling the surface of live eukaryotic or prokaryotic cells is a challenging issue. The most common way is to genetically fuse the protein-of-interest to fluorescent proteins. The formation of the GFP chromophore, which arises from the spontaneous cyclization of a tripeptide is a post-translational modification dependent on the properly folded GFP scaffold<sup>20</sup> which is impaired after secretion<sup>21</sup>. To circumvent this problem, the superfolder GFP (sfGFP) variant was engineered to display more robust refolding properties<sup>22,23</sup>. sfGFP was successfully used to detect fusion proteins exported in the periplasm of *E. coli*<sup>22,24</sup> but not yet employed to address the localization of secreted protein exposed at the surface of Gram-positive bacteria.

Having established the formation of specific covalent Jo-In complexes at the surface of the pneumococcus, we have developed an assay for the detection of proteins at the surface of live cells by confocal fluorescence microscopy using the assembly of Jo-In-GFP complexes. Live pneumococcal cells expressing CbpE-Jo or CbpE-In were incubated with exogenous His-GFP-In or PBS and after extensive washes, the fluorescence of the cells was quantified (see Methods). As shown in Fig. 7a, a fluorescence signal of about 550 arbitrary units (AU) was detected when cells expressing CbpE-Jo were incubated with exogenous His-GFP-In. A comparable fluorescence signal (about 450 AU) was observed with cells expressing a fusion between CbpE and sfGFP. By contrast, the fluorescence signal was decreased by more than 5-fold when cells expressing CbpE-Jo or CbpE-In were incubated with PBS or with His-GFP-In, respectively.

Since comparable fluorescence signals were measured with CbpE-Jo-GFP-In complex and sfGFP, we wondered whether BMW<sup>JOIN</sup> would allow localizing proteins exposed at the surface of live pneumococcal cells. Cells were observed by epifluorescence microscopy and images were analyzed to define the subcellular localization of CbpE (Fig. 7b). Both labeling methods, using the GFP-derived BMW<sup>JOIN</sup> tool or a direct fusion to sfGFP, show that CbpE in live cells displays a heterogeneous localization over the cell surface.

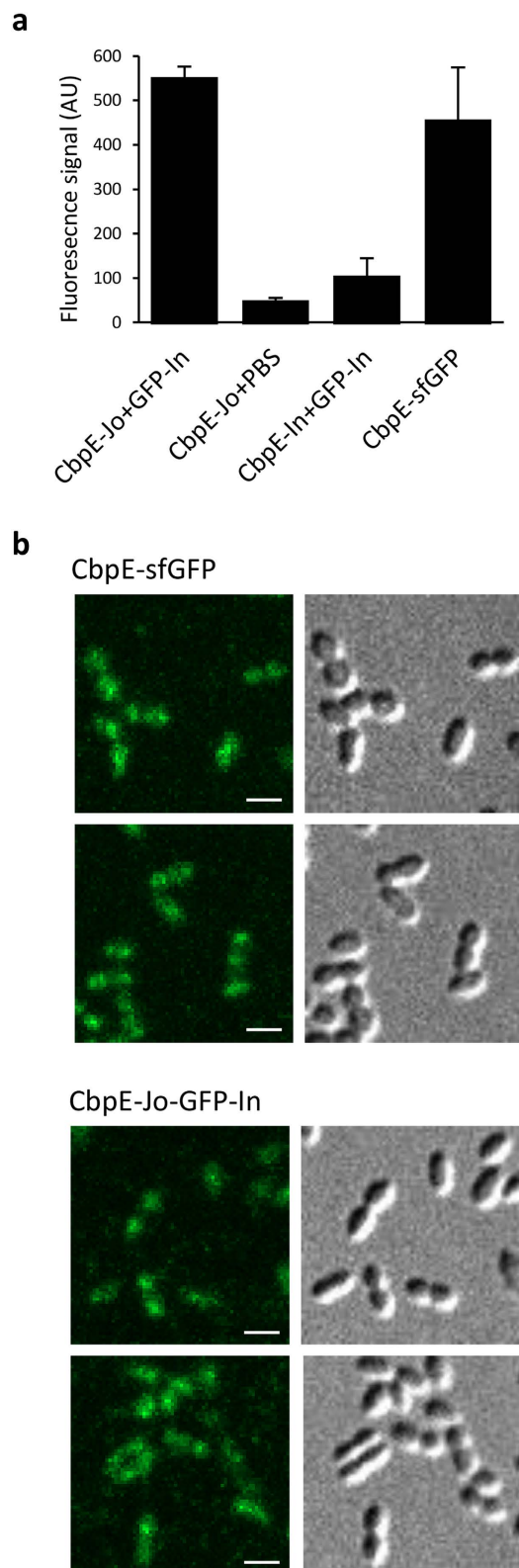
The procedure we have developed to detect proteins exposed at the pneumococcal surface using the BMW<sup>JOIN</sup> tool is rapid (no preliminary sample treatment, limited washes steps or even no wash at all), adapted to live cells, highly specific since it relies on the Jo-In covalent association and restricted to surface proteins. By using the GFP-In version, we were also able to localize CbpE by fluorescence microscopy. The fluorescence intensity and the localization pattern were comparable to the configuration where CbpE was fused to sfGFP, making the BMW<sup>JOIN</sup> procedure a very powerful tool to investigate the dynamic localization of proteins exposed at the surface of live cells. Applications of the BMW tool to detect and/or localize proteins expressed at the surface of other unencapsulated or encapsulated pneumococcal strains of *S. pneumoniae* will be performed in the future. Capsule should not impede the Jo/In proteins to have access to their partner exposed in the underlying spaces (proteins associated to the cell wall or to the membrane). Indeed, we and other groups have detected surface proteins in encapsulated pneumococcal strains, indicating that IgG molecules can cross the capsule although their molecular mass of 150 kDa is far superior to the Jo or In proteins, 10 and 16 kDa, respectively. Work is in progress to extend this application to other bacterial species like in Gram-negative bacteria to evaluate the capacity of Jo and In protein to cross the outer membrane and to eukaryotic cells.

## Methods

**Plasmid construction and site-directed mutagenesis.** The Jo and In sub-domains are the two halves of the *S. pneumoniae* RrgA D2 domain<sup>8</sup> and correspond to residues 144–218 and 587–722, respectively. The *jo* and *in* genes were amplified using the chromosomal DNA of the *S. pneumoniae* TIGR4 strain, and individually cloned into the MCS1 (pBMW2) and MCS2 (pBMW3), respectively, of pETDuet vectors (Novagen), leading to an His-tagged Jo protein while In remained untagged. The *jo* and *in* genes were also inserted in the same pETDuet vector to allow co-expression of His-Jo and In (pBMW4). The *in* gene was also cloned in the MCS1 of the pACYCDuet vector (Novagen) to allow production of an His-tagged In protein (pBMW1). Point mutations were introduced by PCR-based site-directed mutagenesis and verified by DNA sequencing (Beckman Coulter Genomics, Genewiz) (pBMW5, pBMW6, pBMW7). Fusion of Jo and In sequences and insertion of a 7-residues peptide was performed from pBMW4 by site-directed mutagenesis (pBMW8).

The Choline-Binding Domain E (CbDE, residues 335–627) was fused to either Jo or In or to both proteins and cloned into pETDuet and pACYCDuet vectors, all proteins were His-tagged (pBMW9 to pBMW12).

The His-Jo-GPCR\*ECL-In synthetic gene was ordered from GeneArt Gene Synthesis (Life Technologies) and cloned into a pET vector (pBMW13). The *gpcr* gene coding for the full-length GPCR fused to a His-tag at the C-terminal end was cloned in the pIVEX2.3 vector (5PRIME) (pBMW14).



**Figure 7. The BMW<sup>JOIN</sup> toolbox can be used for localization of surface-exposed proteins.** (a) Quantification of the fluorescence signal (see Methods) observed by confocal fluorescence microscopy of unencapsulated pneumococcal cells expressing CbpE-Jo or CbpE-In incubated with PBS or GFP-In. Cells expressing CbpE-sfGFP were also observed in the same conditions. The error bars correspond to the standard deviation of the analysis of five independent frames acquired for each sample. (b) Live *S. pneumoniae* cells expressing CbpE-sfGFP (upper panels) or CbpE-Jo (lower panels) complexed to GFP-In were visualized during exponential phase. GFP green fluorescence (left) and DIC (Differential Interference Contrast) images (right) are shown. Scale bars: 1  $\mu$ m.

The gene encoding the superfolder variant of GFP (sfGFP) was optimized for expression in *S. pneumoniae* (GeneArt, Invitrogen) and cloned at the 5' end of the *in* gene in a His tagged protein expression vector (pADG16).

**Protein expression and purification.** Strains BL21/DE3 STAR or RIL of *E. coli* were used for protein expression, which was induced in Luria Bertani medium with 0.5 mM IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) at 37 °C for 3 h for Jo, In, GFP-In and Hla-His proteins (the latter protein was used as a negative control in the Western blot showed in Fig. 4), at 15 °C overnight for Jo and In proteins fused to CbdE and at 20 °C overnight for the His-Jo-GPCR\* ECL-In construct. Cells from 1-L culture were harvested by centrifugation, resuspended in 50 ml of 50 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 20 mM imidazole and a protease inhibitor cocktail (Complete EDTA free, Sigma-Aldrich) and lysed by sonication for 2 min (2 sec ON and 8 sec OFF). The lysate was clarified by centrifugation (20 min at  $39,191 \times g$  at 4 °C) and loaded onto a 1-ml HisTrap<sup>TM</sup> HP column (GE Healthcare). Proteins of interest were recovered in the flow-through fraction or eluted by steps of increasing concentrations of imidazole (60 mM, 100 mM and 300 mM). They were dialyzed and further purified by gel filtration chromatography.

After Ni-affinity purification, the His-Jo-GPCR\* ECL-In fusion protein was concentrated to about 5 mg/ml using a 10 kDa Amicon Ultra concentrator, dialyzed against 20 mM Phosphate Buffer 150 mM NaCl and processed by Covalab (France) to immunize rabbits.

The full-length His-GPCR was produced in a 2-ml Continuous Exchange Cell Free (CECF) system for 24 h at 37 °C in the presence of Brij58 0.5% and 32  $\mu$ g of DNA (Cell Free Integrated Structural Biology Grenoble Platform). Aggregates were removed by centrifugation. The supernatant was loaded onto a 1-ml HisTrap<sup>TM</sup> HP column equilibrated with 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, Brij58 0.05%. The His-GPCR protein was eluted with 350 mM imidazole and further purified by gel filtration chromatography.

Accurate Jo and In concentrations were determined by BCA assay since the lack of aromatic residues impairs precise concentration determination by measuring the absorbance at 280 nm.

**Covalent complex reconstitution *in vitro*.** The individual Jo and In fusions, as well as the Jo-In complex were separated by SDS-PAGE using 12.5% or 15% polyacrylamide gels. Gels were stained with Coomassie blue and band intensities were quantified using a GelChemiDoc imager (BioRad) and Image J software.

To detect the formation of the covalent complex in the crude bacterial extracts, cells from 1-L culture were resuspended in 50 ml of 50 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl (plus 20 mM imidazole when the protocol includes a Ni-affinity chromatography purification step) and a protease inhibitor cocktail (Complete EDTA free, Sigma-Aldrich). Cells were lysed by sonication for 2 min (2 sec ON and 8 sec OFF). The lysate was clarified by centrifugation (20 min at  $39,191 \times g$  at 4 °C). Samples of 5  $\mu$ l were loaded onto polyacrylamide gels to separate the individual Jo and In from the covalent complex. Bacterial cultures producing separately Jo and In were mixed before cell lysis and purification of the Jo-In complex.

To visualize the formation of the complex *in vitro*, 10  $\mu$ M of purified wild-type or mutant Jo and In proteins were mixed and incubated at 20 °C for 30 min in 50 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl. To stop the reaction, samples were heated in SDS loading buffer for 5 min at 100 °C. The kinetics of the reaction was determined by incubating 10  $\mu$ M of Jo and In in 50 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl at 20 °C. Samples were harvested at different times and frozen to stop the reaction before analysis by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. A complex-reconstitution experiment was also performed during 60 min in different buffers to test the influence of the pH.

The intensities of the Coomassie blue stained bands corresponding to Jo, In and the complex His-Jo-His-In were quantified using the Image J software. Calculation of the proportion of the complex reconstitution was performed by dividing the intensity of the covalent complex by the sum of the intensities of all the bands in the lane, then multiplying by 100.

**Crystallization and data collection.** Crystals of Jo.In covalent complex obtained by co-expression were obtained by hanging-drop vapor diffusion by mixing 1  $\mu$ L of protein (23 mg/mL in 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl) and 1  $\mu$ L of reservoir (2 M ammonium sulfate, 4% isopropanol). Crystals were subsequently cryoprotected in mother liquor containing 20% (v/v) glycerol, mounted in loops, flash-frozen under liquid nitrogen and exposed to the X-ray under a cold nitrogen stream at 100 K. A diffraction data set was collected (Table 2) at the ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) ID23EH2 beamline (Grenoble, France).

**Structure determination and refinement.** Statistics on data collection and refinement are summarized in Table 2. Experimental set up of the beamline and data quality of the collected images were monitored with MxCuBE<sup>25,26</sup> and ADXV<sup>27</sup>. Data was indexed and scaled with XDS program suite<sup>28</sup>. XDSGUI<sup>29</sup> was used to perform data quality and resolution cutoff check-up<sup>30–34</sup>. The reduced reflections information data was imported in to the CCP4 program suite<sup>35</sup>. The structure was solved by Molecular Replacement method (MR) with PHASER<sup>36</sup>, using as a search model the partial structure of RrgA (PDB: 2WW8), residues 186–627. The MR solution structure was rebuilt *de-novo*, in order to remove bias from the model, as implemented in ARP/wARP<sup>37</sup>. The structure was completed (29–630) by cycles of manual model building with COOT<sup>38</sup>. Water molecules were added to the residual electron density map as implemented in ARP/wARP<sup>37</sup>. Cycles of restrained refinement employing NCS and TLS<sup>39,40</sup> were performed with REFMAC<sup>41</sup> as implemented in the CCP4 program suite. Several cycles of manual model building and refinement were performed until  $R_{work}$  and  $R_{free}$  converged<sup>42</sup>. Stereochemical verification was performed with MolProbity<sup>43</sup> and PROCHECK<sup>44</sup>. The secondary structure assignment was verified with DSSP<sup>45</sup>. Figures were generated with PyMol (<http://www.pymol.org>). Final refined model coordinates were deposited at the Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org>)<sup>46</sup>, ID code: 5MKC.

**Antibody production.** The production of rabbit polyclonal antibodies was performed by Covalab (France). The immunization protocol lasted for 67 days and included four antigen injections and four bleeds. His-Jo-GPCR\* ECL-In was purified by Ni-affinity chromatography and dialyzed in 20 mM phosphate

buffer, 150 mM NaCl. Each antigen injection was made with sample of 200  $\mu$ l containing 1.4 mg of purified His-Jo-GPCR \* ECL-In. The final bleed (50 to 70 ml) was processed to purify IgG specifically directed against the GPCR \* ECL.

**Antibody immunopurification.** Immobilization of proteins containing primary amines was performed on CNBr-activated 4B resin following the manufacturer's instructions (GE Healthcare). Briefly, 5 to 10 mg of protein in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.3, 0.5 M NaCl (coupling buffer) was mixed with 1 ml resin and incubated for 2 h at 20 °C. Flow-through was discarded and the resin was washed with coupling buffer. Saturation of free carboxyl groups was realized by incubation with 0.1 M Tris pH 8.0 for 1 h at 20 °C. Uncoupled proteins were eluted by sequential washes with high salt solutions of alternating pH: 0.1 M NaAc pH 4.0, 0.5 M NaCl and 0.1 M Tris pH 8.0, 0.5 M NaCl. A volume of 1 ml of serum was incubated with the antigen-coupled resin previously equilibrated in 0.1 M Tris pH 8.0, 0.1 M NaCl (immunopurification buffer). After extensive washes with immunopurification buffer, IgG were eluted by 0.1 M glycine pH 3.0. Fractions of 500  $\mu$ l were collected in tubes containing 50  $\mu$ l of 1 M Tris pH 8.0 to neutralize the pH.

IgG specifically directed against the GPCR \* ECL sequence were immunopurified from the rabbit polyclonal serum in a two-step procedure. Firstly, His-Jo-In was coupled to a CNBr-activated resin according to the protocol described above and the resin was incubated with the total serum. Antibodies against the His moiety, the Jo and In proteins were retained by the His-Jo-In resin while the antibodies directed against the GPCR \* ECL regions were recovered in the flow-through fraction together with the serum proteins. The second step consisted in coupling the His-Jo-GPCR \* ECL-In fusion protein on a CNBr-activated resin which was subsequently incubated with the fractionated serum sample. Antibodies directed against the GPCR \* ECL moiety were retained and eluted by acidic pH. This procedure allowed to purify 70  $\mu$ g anti-GPCR \* ECL antibodies from 2 ml of total serum.

**Immunoanalysis.** Blotting was performed by Western blotting. Proteins were separated by SDS-PAGE and subsequently electrotransferred on nitrocellulose membrane. Incubations times of 1 h were successively performed using the anti-GPCR \* ECL antibody (diluted 1:500) and the anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated antibody (diluted 1:10,000) in PBS, 0.03% Tween 20, 5% fat-free milk before detection with a chemiluminescent substrate (Thermo-Scientific).

Solid-phase binding assays were performed to test the different batches of immuno-purified antibodies. White 96-well microtiter plates (Greiner Bio One) were coated with 0.1  $\mu$ g to 1  $\mu$ g of His-GPCR, His-Jo-In or BSA as a control in 100  $\mu$ l of PBS at 4 °C overnight. Saturation was performed by adding 200  $\mu$ l/well of PBS, 2% BSA for 1 h at 20 °C. Five washes were performed using 200  $\mu$ l of PBS. The antibodies were diluted 1:1000 in PBS, 0.03% Tween 20, 0.2% BSA and incubated for 1 h at 20 °C. Five washes were performed using 200  $\mu$ l of PBS, 0.03% Tween 20 before adding 100  $\mu$ l/well horseradish peroxidase-conjugated anti-His antibody (Sigma) (1:1,000 dilution) in PBS, 0.03% Tween 20, 0.2% BSA for 1 h at 20 °C. Four washes with 200  $\mu$ l of PBS, 0.03% Tween 20 were performed. ECL solution (Pierce) (100  $\mu$ l) was added to each well, and chemiluminescence was measured using a multiwell luminescence reader (Fluostar Optima, BMG Labtech).

**Bacterial strains and plasmids.** Tables of strains, plasmids, and oligonucleotide primers can be found in Table S1 in the Supplemental Material. The unencapsulated pneumococcal strain R800 was used. Allelic replacements were performed using the Janus method, a two-step procedure, based on a bicistronic *kan-rpsL* cassette called Janus<sup>47</sup>. This method avoids polar effects and allows expression of the fusion proteins at physiological levels. The *cbpE* or *ftsZ* loci were substituted for the Janus (*kan-rpsL*) cassette conferring resistance to kanamycin and dominant streptomycin sensitivity (intermediate strains). Then, recombinant PCR DNA fragments (see Table S1 for primers) comprising the *cbpE* or *ftsZ* gene fused to *jo*, *in* or *sfgfp* genes and flanked on each side by sequences homologous to the upstream and downstream regions of the *cbpE* or *ftsZ* loci were used to transform the intermediate strains. Resistance to streptomycin was used as the selection maker. PCR of the modified *cbpE* or *ftsZ* loci were performed to verify the insertion at the correct position in the chromosome and sequenced to check the absence of mutations.

**Pneumococcal culture.** Growth conditions, media, and bacterial transformation protocols were described previously<sup>48</sup>. Briefly, liquid cultures of *S. pneumoniae* strains were grown at 37 °C in C medium supplemented with 0.5% yeast extract<sup>49</sup> or in Todd Hewitt medium (TH; BD Sciences). For transformation, about 250 ng of DNA was added to cells treated with synthetic competence stimulating peptide 1 in TH pH 8.0 supplemented with 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Cells were grown for 2 h at 37 °C, and transformants were selected on Columbia (BD Sciences) blood (4%) agar plates containing the appropriate antibiotics (streptomycin 400  $\mu$ g/ml or kanamycin 300  $\mu$ g/ml).

**Complex formation at the surface of pneumococcal strains.** Pneumococcal cells expressing CbpE or FtsZ fused to Jo or In proteins were grown in TH medium and harvested at mid-exponential growth phase (OD<sub>600nm</sub> 0.3–0.6). Cells were washed and resuspended in PBS. His-Jo, His-In or His-GFP-In purified proteins were added in the cell suspension at a final concentration of 0.1 mg/ml and incubated with cells at 20 °C for 1 h. Cells were washed, resuspended in PBS and aliquots were mixed with 1/4 volume of Laemmli buffer 4 $\times$  (1 $\times$  buffer composition: 0.1% 2-mercaptoethanol, 0.0005% Bromophenol blue, 10% glycerol, 2% SDS, 63 mM Tris pH 6.8) and boil for 10 min to allow cell lysis. Aliquots were loaded on BioRad Criterion 4–12% gels run in MOPS buffer. Immunodetections were performed with anti-CbpE, anti-FtsZ and anti-His (Sigma) antibodies

**Spinning disk confocal microscopy image acquisition and analysis.** Cells were grown at 37 °C in TH to an OD<sub>600nm</sub> of 0.3, transferred to microscope slides, and observed at 37 °C on an Olympus IX81 microscope equipped with a Yokogawa CSU-X1 confocal spinning disk unit. Image acquisition was performed using a UAPON 100 $\times$  (N.A. 1.49) oil immersion objective and Andor<sup>TM</sup>iXon Ultra Electron Multiplying Charge Coupled

Device (EMCCD) camera. Epifluorescence confocal of GFP signal (488 nm excitation and 520/28 nm emission) and Differential Interference Contrast (DIC) transmission imaging were collected using IQ software (Andor™), and further analyzed using Volocity (Perkin Elmer™). In addition to the specific GFP channel, images were acquired in the red emission channel (561 nm excitation and 617/73 nm emission) to estimate the background autofluorescence signal. In each frame (total of five) and for each cell, the maximal fluorescence intensities were measured and the mean maximal intensity of GFP for each sample was calculated after subtraction of the autofluorescence levels. The error bars correspond to the standard deviation of the analysis of the five independent frames acquired for each sample.

## References

1. Kwon, H., Squire, C. J., Young, P. G. & Baker, E. N. Autocatalytically generated Thr-Gln ester bond cross-links stabilize the repetitive Ig-domain shaft of a bacterial cell surface adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 1367–1372 (2014).
2. Hendrickx, A. P., Budzik, J. M., Oh, S. Y. & Schneewind, O. Architects at the bacterial surface-Sortases and the assembly of pili with isopeptide bonds. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 166–176 (2011).
3. Kang, H. J. & Baker, E. N. Structure and assembly of Gram-positive bacterial pili: unique covalent polymers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 200–207 (2012).
4. Kang, H. J. & Baker, E. N. Intramolecular isopeptide bonds give thermodynamic and proteolytic stability to the major pilin protein of *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* **284**, 20729–20737 (2009).
5. Pointon, J. A. *et al.* A highly unusual thioester bond in a pilus adhesin is required for efficient host cell interaction. *J. Biol. Chem.* **285**, 33858–33866 (2010).
6. El Mortaji, L. *et al.* The full-length *Streptococcus pneumoniae* major pilin RrgB crystallizes in a fiber-like structure, which presents the D1 isopeptide bond and provides details on the mechanism of pilus polymerization. *Biochemical J.* **441**, 833–841 (2012).
7. El Mortaji, L., Terrasse, R., Dessen, A., Vernet, T. & Di Guilmi, A. M. Stability and assembly of pilus subunits of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **285**, 12405–12415 (2010).
8. Izoré, T. *et al.* Structural basis of host cell recognition by the pilus adhesin from *Streptococcus pneumoniae*. *Structure.* **18**, 106–115 (2010).
9. Alegre-Cebollada, J., Badilla, C. L. & Fernandez, J. M. Isopeptide bonds block the mechanical extension of pili in pathogenic *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* **285**, 11235–11242 (2010).
10. Hagan, R. M. *et al.* NMR spectroscopic and theoretical analysis of a spontaneously formed Lys-Asp isopeptide bond. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**, 8421–8425 (2010).
11. Hu, X. *et al.* Autocatalytic intramolecular isopeptide bond formation in gram-positive bacterial pili: a QM/MM simulation. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 478–485 (2011).
12. Zakeri, B. & Howarth, M. Spontaneous intermolecular amide bond formation between side chains for irreversible peptide targeting. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 4526–4527 (2010).
13. Zakeri, B. *et al.* Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, E690–E697 (2012).
14. Veggiani, G. *et al.* Programmable polyproteins built using twin peptide superglues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 1202–1207 (2016).
15. Fairhead, M. *et al.* SpyAvidin hubs enable precise and ultrastable orthogonal nanoassembly. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 12355–12363 (2014).
16. Schoene, C., Bennett, S. P. & Howarth, M. SpyRing interrogation: analyzing how enzyme resilience can be achieved with phytase and distinct cyclization chemistries. *Sci. Rep.* **6**, 21151, doi: 10.1038/srep21151 (2016).
17. Brune, K. D. *et al.* Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization. *Sci. Rep.* **6**, 19234, doi: 10.1038/srep19234 (2016).
18. Rath, A., Glibowicka M., Nadeau V. G., Chen G. & Deber C. M. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 1760–1765 (2009).
19. Hermoso, J. A. *et al.* Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **6**, 533–538. (2005).
20. Pouwels, L. J., Zhang, L., Chan, N. H., Dorrestein, P. C. & Wachter, R. M. Kinetic isotope effect studies on the de novo rate of chromophore formation in fast- and slow-maturing GFP variants *Biochemistry.* **47**, 10111–10122 (2008).
21. Feilmeier B. J., Iseminger G., Schroeder D., Webber H. & Phillips G. J. Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 4068–4076 (2000).
22. Dammeyer, T. & Tinnefeld, P. Engineered fluorescence proteins illuminate the bacterial periplasm. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **3**, doi: 10.5936/csbi.201210013 (2012).
23. Pédelacq, J. D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C. & Waldo, G. S. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **24**, 79–88 (2006).
24. Dinh, T. & Bernhardt, T. G. Using superfolder green fluorescent protein for periplasmic protein localization studies. *J. Bacteriol.* **193**, 4984–4987 (2011).
25. Gabadinho, J. *et al.* MxCuBE: a synchrotron beamline control environment customized for macromolecular crystallography experiments. *J. Synchrotron Radiat.* **17**, 700, doi: 10.1107/S0909049510020005 (2010).
26. Leal, R. M. *et al.* Experimental procedure for the characterization of radiation damage in macromolecular crystals. *J. Synchrotron Radiat.* **18**, 381, doi: 10.1107/S0909049511002251 (2011).
27. ADVX. A Program to Display X-ray Diffraction Images. <http://www.scripps.edu/~arvai/adxv.html> (2016).
28. Kabsch, W. XDS. *Acta Cryst.* **D66**, 125–132 (2010).
29. XDSGUI. XDS. Graphical Interface. <http://strucbio.biologie.uni-konstanz.de/xdswiki/index.php/XDSGUI> (2017).
30. Diederichs, K. & Karplus, P. A. Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 269–275 (1997).
31. Karplus, P. A. & Diederichs, K. Linking crystallographic model and data quality. *Science.* **336**, 1030–1033 (2012).
32. Diederichs, K. & Karplus, P. A. Better models by discarding data? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **69**, 1215–1222 (2013).
33. Karplus, P. A. & Diederichs, K. Assessing and maximizing data quality in macromolecular crystallography. *Curr Opin Struct Biol.* **34**, 60–68 (2015).
34. Evans, P. R. & Murshudov, G. N. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **69**, 1204–1214 (2013).
35. Winn, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **67**, 235–242 (2011).
36. McCoy, A. J. *et al.* Phaser Crystallographic Software. *J. Appl. Cryst.* **40**, 658–674 (2007).
37. Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S. & Perrakis, A. Automated macromolecular model building for x-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat. Protoc.* **3**, 1171–1179 (2008).
38. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).



39. Painter, J. & Merrit, E. A. TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models. *J. Appl. Cryst.* **39**, 109–111 (2006).
40. Merritt, E. A. To B or not to B: a question of resolution? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **68**, 468–477 (2012).
41. Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **67**, 355–367 (2011).
42. Brünger, A. T. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472–475 (1992).
43. Chen, V. B. *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **66**, 12–21 (2010).
44. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Cryst.* **26**, 283–291 (1993).
45. Kabsch, W. & Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577–637 (1983).
46. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **28**, 235–242 (2000).
47. Sung, C. K., Li, H., Claverys, J. P. & Morrison, D. A. An *rpsL* cassette, *Janus*, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5190–5196 (2001).
48. Jacq, M. *et al.* Remodeling of the Z-ring nanostructure during *Streptococcus pneumoniae* cell cycle revealed by photoactivated localization microscopy. *mBio* **18**, doi: 10.1128/mBio01108 (2015).
49. Lacks, S. & Hotchkiss, K. D. A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **39**, 508–518 (1960).

## Acknowledgements

We acknowledge the platforms of the Grenoble Instruct center (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) supported by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology Initiative FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and by the Grenoble Alliance for Integrated Structural Cell Biology GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). Support for this work comes in part from the Agence Nationale de la Recherche (grants ANR-11-BSV8-005-01 PILIPATH, ANR-12-BSV3-0003-01 PVL-Suscept), the Commissariat à l’Energie Atomique (Fonds de soutien technologique à la valorisation des recherches de DSV, 2011) and the University of Grenoble Alpes. B. J. was funded by a Ph.D. grant from the Grenoble Alpes University. We are grateful to T. Henry for providing us with the C5aR cDNA and to C. Grangeasse for providing us with the *ftsZ Janus* intermediate strain (*ftsZ-kan-rpsL*).

## Author Contributions

B.J., C.J., T.G. performed the experiments. C.-M.C. solved the crystal structure. K.J.P. performed the microscopy observations and analyzed data. V.T. and D.G.A.M. designed the research and analyzed data. M.C., V.T. and D.G.A.M. wrote the paper. All authors reviewed the manuscript.

## Additional Information

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

**Competing Interests:** V.T. and D.G.A.M. are inventors on a patent relating to the autocatalytic association of proteins (S39394 QT EP).

**How to cite this article:** Bonnet, J. *et al.* Autocatalytic association of proteins by covalent bond formation : a Bio Molecular Welding toolbox derived from a bacterial adhesin. *Sci. Rep.* **7**, 43564; doi: 10.1038/srep43564 (2017).

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



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

© The Author(s) 2017

## Autocatalytic association of proteins by covalent bond formation : a Bio Molecular Welding toolbox derived from a bacterial adhesin

Bonnet J.<sup>1</sup>, Cartannaz J.<sup>1</sup>, Tourcier G.<sup>2</sup>, Contreras-Martel C.<sup>1</sup>, Kleman J.P.<sup>1</sup>, Morlot C.<sup>1</sup>, Vernet T.<sup>1\*</sup>, and Di Guilmi A.M.<sup>1\*</sup>

**Figure S1:** RrgA, Jo and In sequences. Lys191 (Jo sequence), Asp600 (In sequence) and Asn695 (In sequence) residues involved in the formation of the isopeptide bond are highlighted in grey.

### RrgA (Jo and In sequences are underlined)

MLNRETHMKKVRKIFQKAVAGLCCISQLTAFSSIVALAETPETSIPAIGKVVIKETGEGGALLGDVAVFELKN  
NTDGTTVSQRTEAQTGEAIFSNIKPGTYTLTEAOPPVGYPSTKQWTVEVEKNGRRTTVQGEQVENREALS  
DQYPQTGTYPDVQTPYQIIKVDGSEKNGQHKALNPNPYERVIPGTLISKRIYQVNNLDDNQYGIELTVSGK  
TVYEQDKDSVPLDVVILLDNSNSMSNIRNKNARRAERAGEATRSLIDKITSDSENVALVITYASTIFDGTE  
FTVEKGVADKNGKRLNDSLFWNYDQTSFTTNTKDYSYLKLTNDKNDIVELKNKVPTEAEDHDGNRLMYQFG  
ATFTQKALMKADEILTQQARQNSQKVI FHI TDGVP TMSYP INFNHATFAPSYQNLNAFFSKSPNKDGILL  
SDFITQATSGEHTIVRGDQGSYQMFTDKTVYEKGAPAAFPVKPEKYSEMKAAGYAVIGDPINGGYIWLNWR  
ESILAYPFNSNTAKITNHGDPTRWYNGNIAPDGYDVFTVIGINGDPGTDEATATSFMQSISSEKPENYTN  
VTDTTKILEQLNRYFHTIVTEKKSIENTITDPMGELIDLQLGTDGRFDPADYTLTANDGSRLENGQAVGG  
PQNDGGLLKNKAVLYDTEKRIRVTGLYLGTDEKVTLTYNVRLNDEFVSNKFYDTNGRRTLHPKEVEQNTV  
RDFPIPKIRDVRKYPEITTSKEKGLGDI EFKVNKNDKKPLRGAVFSLQKQHPDYDPIYGAIDQNGTYQNV  
RTGEDGKLTFFKNLSDGKYRLFENSEPAGYKPVQNKPIVAFQIVNGEVRDVTSIVPQDIPAGYEF TNDKHYI  
TNEPIPPKREYPRGTGGIGMLPFYLI GCM MMGGVLLYTRKHP

### Jo : residues 142 to 220 in RrgA sequence (underlined)

SDQYPQTGTYPDVQTPYQIIKVDGSEKNGQHKALNPNPYERVIPGTLISKRIYQVNNLDDNQYGIELTVSG  
KTVYEQKD

TCTGACCAGTATCCACAAACAGGGACTTATCCAGATGTTCAAACACCTTATCAGATTATTAAGGTAGATGG  
TTCGGAACAAAAACGGACAGCACAAGGCGTTGAATCCGAATCCATATGAACGTGTGATCCAGAAGGTACAC  
TTTCAAAGAGAAATTTATCAAGTGAATAATTTGGATGATAACCAATATGGAATCGAATGACGGTTAGTGGG  
AAAACAGTGTATGAACAAAAGAT

### In : residues 588 to 722 in RrgA sequence (underlined)

TEKKSIENTITDPMGELIDLQLGTDGRFDPADYTLTANDGSRLENGQAVGGPQNDGGLLKNKAVLYDTE  
KRIRVTGLYLGTDEKVTLTYNVRLNDEFVSNKFYDTNGRRTLHPKEVEQNTVRDFPIPKIRDVR

ACTGAAAAGAAATCAATTGAGAATGGTACGATTACAGATCCGATGGGTGAGTTAATTGATTTGCAATTGGG  
CACAGATGGAAGATTTGATCCAGCAGATTACACTTTAACTGCAAACGATGGTAGTCGCTTGGAGAATGGAC  
AAGCTGTAGGTGGTCCACAAAATGATGGTGGTTTTGTTAAAAAATGCAAAGTGCTCTATGATACGACTGAG  
AAAAGGATTCGTGTAACAGGTCTGTACCTTGGAACGGATGAAAAGTTACGTTGACCTACAATGTTTCGTTT  
GAATGATGAGTTTGAAGCAATAAATTTTATGATACCAATGGTCAACAACCTTACATCCTAAGGAAGTAG  
AACAGAACACAGTGC GCGACTTCCCGATTCCCTAAGATTCGTGATGTGCGG

**Table S1: Strains, Plasmids and Oligonucleotides**

Construct	Genotype/description/sequence	Source
<b><i>S. pneumoniae</i> strains</b>		
R800	<i>R6 rpsL1 ; Str<sup>R</sup></i>	1
CbpE-Jo	<i>R800 rpsL1 ; cbpE::cbpE-jo ; Str<sup>R</sup></i>	This work
CbpE-In	<i>R800 rpsL1 ; cbpE::cbpE-in ; Str<sup>R</sup></i>	This work
CbpE-sfGFP	<i>R800 rpsL1 ; cbpE::cbpE-sfGFP ; Str<sup>R</sup></i>	This work
FtsZ-Jo	<i>R800 rpsL1 ; ftsZ::ftsZ-jo ; Str<sup>R</sup></i>	This work
FtsZ-In	<i>R800 rpsL1 ; ftsZ::ftsZ-in ; Str<sup>R</sup></i>	This work
<b>Plasmids</b>		
pBMW1	<i>His6-In (pACYCDuet)</i>	This work
pBMW2	<i>His6-Jo (pETDuet)</i>	This work
pBMW3	<i>In (pETDuet)</i>	This work
pBMW4	<i>His6-Jo + In (pETDuet)</i>	This work
pBMW5	<i>His6-In<sup>D600A</sup> (pACYCDuet)</i>	This work
pBMW6	<i>His6-Jo<sup>K191A</sup> (pETDuet)</i>	This work
pBMW7	<i>His6-In<sup>N695A</sup> (pACYCDuet)</i>	This work
pBMW8	<i>His6-Jo-GSTPGSV-In (pETDuet)</i>	This work
pBMW9	<i>His6-Jo-CbdE (pETDuet)</i>	This work
pBMW10	<i>His6-In-CbdE (pACYCDuet)</i>	This work
pBMW11	<i>His6-Jo-CbdE-Jo (pETDuet)</i>	This work
pBMW12	<i>His6-Jo-CbdE-In (pETDuet)</i>	This work
pBMW13	<i>His6-Jo-GPCR*ECL-In (pETDuet)</i>	This work
pBMW14	<i>His6-GPCR (pIVEX2.3)</i>	This work
pADG16	<i>His8-sfGFP-In (pET vector)</i>	This work
<b>Oligonucleotides</b>		
FORpBMW1	CGCGGATCCGACTGAAAAGAAATCAATTGAGAATGG	This work
REVpBMW1	GCGCTCGAGTCAATCACGAATCTTAGGAATCGGGAAGTCC	This work
FORpBMW2	CGCGGATCCGTCTGACCAGTATCCACAAACAGGG	This work
REVpBMW2	GCGGTCGACTCAATCTTTTTGTTTCATACACTGTTTTCCC	This work
FORpBMW3	CGCAGATCTGACTGAAAAGAAATCAATTGAGAATGG	This work
REVpBMW3	GCGCTCGAGTCAATCACGAATCTTAGGAATCGGGAAGTCC	This work
FORpBMW5	TCAATTGAGAATGGTACGATTACAGTCCGATGGGTGAGTTAATTGATTTGC	This work
REVpBMW5	GCAAATCAATTAACCTACCCATCGGAGCTGTAATCGTACCATTCTCAATTGA	This work
FORpBMW6	GTGATTCCAGAAGGTACTTTTCAGCGAGAATTTATCAAGTGAATAATTTGG	This work
REVpBMW6	CCAAATTATTCACTTGATAAATTTCTCGCTGAAAAGTGTACCTTCTGGAATCAC	This work
FORpBMW7	GTAAGCAATAAATTTTATGATACCGCTGGTTCGAACAACCTTACATCCTAAGG	This work
REVpBMW7	CCTTAGGATGTAAGGTTGTTTCGACCAGCGGTATCATAAAATTTATTGCTTAC	This work
FORpBMW8	GGGAAAACAGTGATGAACAAAAGATGGTCTACCCCGGGTCTGTACTGAAAAGAAA	This work
REVpBMW8	TCAATTGAGAATGG CCATTCTCAATTGATTTCTTTTCAGTAACAGAACCCGGGTAGAACCATCTTTTTGTTTCATA CACTGTTTTCCC	This work
FORpBMW9-1	GGAAAACAGTGATGAACAAAAGATCTGCAGGTCGACAAGCTTGCGGCCGATAATGCT TAAG	This work
REVpBMW9-1	CTTAAGCATTATGCGGCCGCAAGCTTGTCGACCTGCAGATCTTTTTGTTTCATACACTGTTTT CC	This work
FORpBMW9-2	CGCCTGCAGCAAGCTGGTTGGCATAAGAGTGCATATGGG	This work
REVpBMW9-2	GCGGTCGACCTGTTCTGATTCCGATTTGTTTACACTCG	This work
FORpBMW10-1	CGACTTCCGATTCTAAGATTCTGATCTGCAGGTCGACAAGCTTGCGGCCGATAATGC TTAAGTCG	This work
REVpBMW10-1	CGACTTAAGCATTATGCGGCCGCAAGCTTGTCGACCTGCAGATCACGAATCTTAGGAATCG GGAAGTCG	This work
FORpBMW11	CGCGTCGACAAGCTTTCTGACCAGTATCCACAAACAGGGAC	This work
REVpBMW11	GCGGCGGCCGCTTAATCTTTTTGTTTCATACACTGTTTTCCC	This work
FORpBMW12	CGCGTCGACAAGCTTACTGAAAAGAAATCAATTGAGAATGGTACG	This work
REVpBMW12	GCGGCGGCCGCTTAATCACGAATCTTAGGAATCGGGAAGTCGC	This work
FORpBMW14	CGCGCGGCCGCAATAGCTTAACTATACCACACCG	This work
REVpBMW14	GCGCTCGAGAACTGCCTGTGTTTTCTGTGC	This work
pADG16For	CGCAAGCTTACTGAAAAGAAATCAATTGAGAATGG	This work
pADG16Rev	GCGCTCGAGTTATTAATCACGAATCTTAGGAATCGGGAAG	This work
FORJanus	CCGTTTGATTTTAAATGGATAATG	2
REVJanus	AGAGACCTGGGCCCTTTCC	2
FOR1CbpE	CGCAGCCAGCAAAGACTATG	This work
REV1CbpE	CCATTAATAAATCAAACGGCTGTTCTGATTCCGATTTG	This work
FOR2CbpEGFP	GGAAAAGGGGCCAGGTCTCTGAAAAGAAGGTTTTAGGGCC	This work
REV2CbpEGFP	CCAAGTGATTTTCCACTTTCC	This work
REV3CbpEGFP	CCTTAGAACCGGTCGTACGCTGTCTGATTCCGATTTG	This work

FOR4CbpEGFP	CAAATCGGAATCAGAACAGCGTACGACCGGTTCTAAAGG	This work
REV4CbpEGFP	GGCCCTAAAACCTTCTTTTCTATTATTTGTACAATTCATCC	This work
FOR5CbpEGFP	GGATGAATTGTACAAAATAAAGAAAAGAAGGTTTTAGGGCC	This work
REV5CbpEGFP	GATAAGTTCTGAACCGTCTGACGCTGTTCTGATTCCGATTG	This work
FOR6CbpEGFP	CAAATCGGAATCAGAACAGCGTACGACCGGTTCAGAACTTATC	This work
REV6CbpEGFP	GGCCCTAAAACCTTCTTTTCTATTAAACGGTGTCCAATTTACTAGG	This work
FOR7CbpEGFP	CCTAGTAAATTGGGACACCGTTAATAAGAAAAGAAGGTTTTAGGGCC	This work
FORJo1	TCTGACCAGTATCCACAACA	This work
REVJo2	TTAATCTTTTGTTCATACACTGTTTTT	This work
REVCbpEJoJB23	GTTTGTGGATACTGGTCAGACTGTTCTGATTCCGATTGT	This work
FORCbpEJoJB24	TGTATGAACAAAAAGATTAATAGAAAAGAAGGTTTTAGGGC	This work
FORIn1	ACTGAAAAGAAATCAATTGAGAATG	This work
REVIn2	TTAATCACGAATCTTAGGAATCGG	This work
REVCbpEInJB25	TCAATTGATTTCTTTTCAGTCTGTTCTGATTCCGATTGT	This work
FORCbpEInJB26	TTCTAAGATTTCGTGATTAATAGAAAAGAAGGTTTTAGGGC	This work
FORFtsJoMJ42	CCTATCCGCCTCTTGCAAGC	This work
REVFtsJoMJ47	GTAGGAGAGAACCATGTCTTTAAAAG	This work
REVFtsJoJB15	GTTTGTGGATACTGGTCAGAACGATTTTGA AAAATGGAGGT	This work
FORFtsJoJB16	TGTATGAACAAAAAGATTAACATTTTTCAAAAATCGTTAAGTAAAT	This work
FORFtsZInMJ42	CCTATCCGCCTCTTGCAAGC	This work
REVFtsZInMJ47	GTAGGAGAGAACCATGTCTTTAAAAG	This work
REVFtsZInJB17	TCAATTGATTTCTTTTCAGTACGATTTTGA AAAATGGAGGT	This work
FORFtsZInJB18	TTCTAAGATTTCGTGATTAACATTTTTCAAAAATCGTTAAGTAAAT	This work

1. Lefevre, J. C., Claverys, J. P. & Sicard, A. M. Donor deoxyribonucleic acid length and marker effect in pneumococcal transformation. *J. Bacteriol.* **138**, 80-86 (1979).
2. Sung, C. K., Li, H., Claverys, J. P. & Morrison, D. A. An *rpsL* cassette, *Janus*, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5190-5196 (2001).



# Bibliographie

- ABDULLAH, Mohammed R et al. (2014). « Structure of the pneumococcal l,d-carboxypeptidase DacB and pathophysiological effects of disabled cell wall hydrolases DacA and DacB. » In : *Mol. Microbiol.* 93.6, p. 1183–206. ISSN : 1365-2958. DOI : 10.1111/mmi.12729.
- ALBARRACÍN ORIO, Andrea G et al. (2011). « Compensatory evolution of pbp mutations restores the fitness cost imposed by  $\beta$ -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *PLoS Pathog.* 7.2, e1002000. ISSN : 1553-7374. DOI : 10.1371/journal.ppat.1002000.
- ANDRE, Greiciely O et al. (2017). « Role of *Streptococcus pneumoniae* Proteins in Evasion of Complement-Mediated Immunity. » In : *Front. Microbiol.* 8, p. 224. DOI : 10.3389/fmicb.2017.00224.
- ANDRE, Guillaume et al. (2011). « Fluorescence and atomic force microscopy imaging of wall teichoic acids in *Lactobacillus plantarum*. » In : *ACS Chem. Biol.* 6.4, p. 366–76. ISSN : 1554-8937. DOI : 10.1021/cb1003509.
- ARBELOA, Ana et al. (2004). « Role of class A penicillin-binding proteins in PBP5-mediated beta-lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. » In : *J. Bacteriol.* 186.5, p. 1221–8. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/JB.186.5.1221-1228.2004.
- ARMSTRONG, J. J. et al. (1958). « Isolation and structure of ribitol phosphate derivatives (teichoic acids) from bacterial cell walls ». In : *J. Chem. Soc.* 0, p. 4344. DOI : 10.1039/jr9580004344.
- ATILANO, Magda L et al. (2010). « Teichoic acids are temporal and spatial regulators of peptidoglycan cross-linking in *Staphylococcus aureus*. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107.44, p. 18991–6. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1004304107.
- ATKINSON, W, S WOLFE et J HAMBORSKY (2015). *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. 13th. Centers for Disease Control et Prevention.
- ATTAECH, Laetitia et al. (2011). « Role of the Single-Stranded DNA-Binding Protein SsbB in Pneumococcal Transformation : Maintenance of a Reservoir for

- Genetic Plasticity ». In : *PLoS Genet.* 7.6. Sous la dir. d'Ivan MATIC, e1002156. ISSN : 1553-7404. DOI : 10.1371/journal.pgen.1002156.
- ATTALI, Cécile et al. (2008). « Streptococcus pneumoniae choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix ». In : *Infect. Immun.* 76.2, p. 466–476. ISSN : 00199567. DOI : 10.1128/IAI.01261-07.
- AUBRY, Camille et al. (2011). « OatA, a peptidoglycan O-acetyltransferase involved in *Listeria monocytogenes* immune escape, is critical for virulence. » In : *J. Infect. Dis.* 204.5, p. 731–40. ISSN : 1537-6613. DOI : 10.1093/infdis/jir396.
- AVERY, O T, C M MACLEOD et M MCCARTY (1944). « STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. » In : *J. Exp. Med.* 79.2, p. 137–58. ISSN : 0022-1007.
- AZUMA, I. et al. (1970). « Occurrence of N-glycolylmuramic acid in bacterial cell walls ». In : *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 208.3, p. 444–451. ISSN : 03044165. DOI : 10.1016/0304-4165(70)90217-5.
- BACKUS, Keriann M et al. (2011). « Uptake of unnatural trehalose analogs as a reporter for *Mycobacterium tuberculosis* ». In : *Nat. Chem. Biol.* 7.4, p. 228–235. ISSN : 1552-4450. DOI : 10.1038/nchembio.539.
- BAI, Xiao Hui et al. (2014). « Structure of pneumococcal peptidoglycan hydrolase LytB reveals insights into the bacterial cell wall remodeling and pathogenesis ». In : *J. Biol. Chem.* 289.34, p. 23403–23416. ISSN : 1083351X. DOI : 10.1074/jbc.M114.579714.
- BAJAJ, Ruchika et al. (2016). « Biochemical characterization of essential cell division proteins FtsX and FtsE that mediate peptidoglycan hydrolysis by PcsB in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *Microbiologyopen* 5.5, p. 738–752. ISSN : 2045-8827. DOI : 10.1002/mbo3.366.
- BALACHANDRAN, P et al. (2001). « The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. » In : *J. Bacteriol.* 183.10, p. 3108–16. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/JB.183.10.3108-3116.2001.
- BANDARA, Mikaila et al. (2017). « The accessory Sec system (SecY2A2) in *Streptococcus pneumoniae* is involved in export of pneumolysin toxin, adhesion and biofilm formation ». In : *Microbes Infect.* ISSN : 12864579. DOI : 10.1016/j.micinf.2017.04.003.

- BARENDT, Skye M, Lok-To SHAM et Malcolm E WINKLER (2011). « Characterization of mutants deficient in the L,D-carboxypeptidase (DacB) and WalRK (VicRK) regulon, involved in peptidoglycan maturation of *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 strain D39. » In : *J. Bacteriol.* 193.9, p. 2290–300. ISSN : 1098-5530. DOI : 10.1128/JB.01555-10.
- BARRETEAU, Hélène et al. (2008). « Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis ». In : *FEMS Microbiol. Rev.* 32.2, p. 168–207. ISSN : 1574-6976. DOI : 10.1111/j.1574-6976.2008.00104.x.
- BARTUAL, Sergio G et al. (2014). « Structural basis of PcsB-mediated cell separation in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *Nat. Commun.* 5, p. 3842. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/ncomms4842.
- BAUR, Stefanie et al. (2009). « Synthesis of CDP-activated ribitol for teichoic acid precursors in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *J. Bacteriol.* 191.4, p. 1200–10. ISSN : 1098-5530. DOI : 10.1128/JB.01120-08.
- BEAUSSART, Audrey et al. (2014). « Molecular mapping of the cell wall polysaccharides of the human pathogen *Streptococcus agalactiae*. » In : *Nanoscale* 6.24, p. 14820–7. ISSN : 2040-3372. DOI : 10.1039/c4nr05280c.
- BEILHARZ, Katrin et al. (2012). « Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109.15, E905–13. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1119172109.
- BERA, Agnieszka et al. (2004). « Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant ? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus* ». In : *Mol. Microbiol.* 55.3, p. 778–787. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2004.04446.x.
- (2005). « Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant ? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus* ». In : *Mol. Microbiol.* 55.3, p. 778–787. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2004.04446.x.
- BERA, Agnieszka et al. (2006). « The presence of peptidoglycan O-acetyltransferase in various staphylococcal species correlates with lysozyme resistance and pathogenicity. » In : *Infect. Immun.* 74.8, p. 4598–604. ISSN : 0019-9567. DOI : 10.1128/IAI.00301-06.
- BERG, K. H., D. STRAUME et L. S. HAVARSTEIN (2014). « The function of the transmembrane and cytoplasmic domains of pneumococcal penicillin-binding proteins 2x and 2b extends beyond that of simple anchoring devices ». In : *Microbiology* 160.Pt\_8, p. 1585–1598. ISSN : 1350-0872. DOI : 10.1099/mic.0.078535-0.



- BERG, Kari Helene et al. (2011). « Peptide-regulated gene depletion system developed for use in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *J. Bacteriol.* 193.19, p. 5207–15. ISSN : 1098-5530. DOI : 10.1128/JB.05170-11.
- BERG, Kari Helene et al. (2013). « Effects of low PBP2b levels on cell morphology and peptidoglycan composition in *Streptococcus pneumoniae* R6. » In : *J. Bacteriol.* 195.19, p. 4342–54. ISSN : 1098-5530. DOI : 10.1128/JB.00184-13.
- BERGÉ, Matthieu J. et al. (2013). « Midcell Recruitment of the DNA Uptake and Virulence Nuclease, EndA, for Pneumococcal Transformation ». In : *PLoS Pathog.* 9.9. Sous la dir. de Gary DUNNY, e1003596. ISSN : 1553-7374. DOI : 10.1371/journal.ppat.1003596.
- BERGMANN, Simone et Sven HAMMERSCHMIDT (2006). « Versatility of pneumococcal surface proteins ». In : *Microbiology* 152.2, p. 295–303. ISSN : 13500872. DOI : 10.1099/mic.0.28610-0.
- BERICAL, Andrew C. et al. (2016). « Pneumococcal Vaccination Strategies. An Update and Perspective ». In : *Ann. Am. Thorac. Soc.* 13.6, p. 933–944. ISSN : 2329-6933. DOI : 10.1513/AnnalsATS.201511-778FR.
- BERNARD, Elvis et al. (2011). « Characterization of O-acetylation of N-acetylglucosamine : a novel structural variation of bacterial peptidoglycan. » In : *J. Biol. Chem.* 286.27, p. 23950–8. ISSN : 1083-351X. DOI : 10.1074/jbc.M111.241414.
- BERNARD, Elvis et al. (2012). « Dual Role for the O-Acetyltransferase OatA in Peptidoglycan Modification and Control of Cell Septation in *Lactobacillus plantarum* ». In : *PLoS One* 7.10. ISSN : 19326203. DOI : 10.1371/journal.pone.0047893.
- BERRY, A M et J C PATON (2000). « Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. » In : *Infect. Immun.* 68.1, p. 133–40. ISSN : 0019-9567.
- BERRY, A M et al. (1989). « Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. » In : *Infect. Immun.* 57.8, p. 2324–30. ISSN : 0019-9567.
- BESANCENEY-WEBLER, Christen et al. (2011). « Metabolic labeling of fucosylated glycoproteins in Bacteroidales species ». In : *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21.17, p. 4989–4992. ISSN : 0960894X. DOI : 10.1016/j.bmcl.2011.05.038.
- BISWAS, Raja et al. (2012). « Proton-binding capacity of *Staphylococcus aureus* wall teichoic acid and its role in controlling autolysin activity. » In : *PLoS One* 7.7. Sous la dir. de Vance G. FOWLER, e41415. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0041415.

- BLAIR, David E et al. (2005). « Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102.43, p. 15429–34. ISSN : 0027-8424. DOI : 10.1073/pnas.0504339102.
- BLAKE, C C F et al. (1965). « Structure of hen egg-white lysozyme, a three dimensional fourier synthesis at 2 Ångstroms resolution ». In : *Nature* 206.4986, p. 757–761. ISSN : 0028-0836. DOI : 10.1038/206757a0.
- BLUNDELL, J K et H R PERKINS (1981). « Effects of beta-lactam antibiotics on peptidoglycan synthesis in growing *Neisseria gonorrhoeae*, including changes in the degree of O-acetylation. » In : *J. Bacteriol.* 147.2, p. 633–41. ISSN : 0021-9193.
- BLUNDELL, J.Keith et al. (1980). « The peptidoglycan of *Neisseria gonorrhoeae* : O-acetyl groups and lysozyme sensitivity ». In : *FEMS Microbiol. Lett.* 9.4, p. 259–261. DOI : 10.1111/j.1574-6968.1980.tb05648.x.
- BOERSMA, Michael J. et al. (2015). « Minimal Peptidoglycan (PG) Turnover in Wild-Type and PG Hydrolase and Cell Division Mutants of *Streptococcus pneumoniae* D39 Growing Planktonically and in Host-Relevant Biofilms ». In : *J. Bacteriol.* 197.21. Sous la dir. de P. de BOER, p. 3472–3485. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/JB.00541-15.
- BORRMANN, Annika et al. (2014). « Bioorthogonal chemistry in living organisms ». In : *Chem. Sci.* 5.6, p. 2123. ISSN : 2041-6520. DOI : 10.1039/c3sc52768a.
- BOUHSS, Ahmed et al. (2008). « The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates ». In : *FEMS Microbiol. Rev.* 32.2, p. 208–233. ISSN : 1574-6976. DOI : 10.1111/j.1574-6976.2007.00089.x.
- BRIDY-PAPPAS, Angela E. et al. (2005). « *Streptococcus pneumoniae* : Description of the Pathogen, Disease Epidemiology, Treatment, and Prevention ». In : *Pharmacotherapy* 25.9, p. 1193–1212. ISSN : 0277-0008. DOI : 10.1592/phco.2005.25.9.1193.
- BRILES, E B et A TOMASZ (1973). « Pneumococcal Forssman antigen. A choline-containing lipoteichoic acid. » In : *J. Biol. Chem.* 248.18, p. 6394–7. ISSN : 0021-9258.
- BRILES, Eve Barak et Alexander TOMASZ (1970). « Radioautographic evidence for equatorial wall growth in a gram-positive bacterium. Segregation of choline-3H-labeled teichoic acid. » In : *J. Cell Biol.* 47.3, p. 786–790. ISSN : 00219525.
- BROWN, Jeremy, Sven HAMMERSCHMIDT et Carlos ORIHUELA (2015). *Streptococcus pneumoniae : molecular mechanisms of host-pathogen interactions*. ISBN : 9780124105300.

- BROWN, Stephanie, John P. SANTA MARIA et Suzanne WALKER (2013). « Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria ». In : *Annu. Rev. Microbiol.* 67.1, p. 313–336. ISSN : 0066-4227. DOI : 10.1146/annurev-micro-092412-155620. arXiv : NIHMS150003.
- BRUNDISH, D E et J BADDILEY (1967). « The characterization of pneumococcal C-polysaccharide as a ribitol teichoic acid. » In : *Biochem. J.* 105.2, p. 30C–31C. ISSN : 0264-6021.
- (1968). « Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. » In : *Biochem. J.* 110.3, p. 573–82. ISSN : 0264-6021.
- BRYANT, Joseph C. et al. (2016). « Pyruvate oxidase of *Streptococcus pneumoniae* contributes to pneumolysin release ». In : *BMC Microbiol.* 16.1, p. 271. ISSN : 1471-2180. DOI : 10.1186/s12866-016-0881-6.
- BUI, Nhat Khai et al. (2012). « Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae* ». In : *Anal. Biochem.* 421.2, p. 657–666. ISSN : 00032697. DOI : 10.1016/j.ab.2011.11.026.
- BUIST, Girbe et al. (2008). « LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans ». In : *Mol. Microbiol.* 68.4, p. 838–847. ISSN : 0950-382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2008.06211.x.
- BURGHHAUS, P et al. (1983). « The influence of different antibiotics on the degree of O-acetylation of staphylococcal cell walls ». In : *Target Penicillin. Murein Sacculus Bact. Cell Walls Archit. Growth.* Walter de Gruyter, New York, p. 317–322.
- BURGHOUT, Peter et al. (2007). « Search for genes essential for pneumococcal transformation : the RADA DNA repair protein plays a role in genomic recombination of donor DNA. » In : *J. Bacteriol.* 189.18, p. 6540–50. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/JB.00573-07.
- CALLEWAERT, L et C W MICHIELS (2010). « Lysozymes in the animal kingdom ». In : *J Biosci* 35.1, p. 127–160. DOI : 10.1007/s12038-010-0015-5.
- CAMPBELL, Jennifer et al. (2011). « Synthetic lethal compound combinations reveal a fundamental connection between wall teichoic acid and peptidoglycan biosyntheses in *Staphylococcus aureus*. » In : *ACS Chem. Biol.* 6.1, p. 106–16. ISSN : 1554-8937. DOI : 10.1021/cb100269f.
- CANVIN, J R et al. (1995). « The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. » In : *J. Infect. Dis.* 172.1, p. 119–23.

- CARAPITO, Raphaël et al. (2006). « Pneumococcal  $\beta$ -Lactam Resistance Due to a Conformational Change in Penicillin-binding Protein 2x ». In : *J. Biol. Chem.* 281.3, p. 1771–1777. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.M511506200.
- CARDACI, Angela et al. (2012). « Protective Activity of Streptococcus pneumoniae Spr1875 Protein Fragments Identified Using a Phage Displayed Genomic Library ». In : *PLoS One* 7.5. Sous la dir. de Gunnar F. KAUFMANN, e36588. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0036588.
- CAVA, Felipe et Miguel A de PEDRO (2014). « Peptidoglycan plasticity in bacteria : emerging variability of the murein sacculus and their associated biological functions ». In : *Curr. Opin. Microbiol.* 18, p. 46–53. ISSN : 13695274. DOI : 10.1016/j.mib.2014.01.004.
- CAVA, Felipe et al. (2011). « Emerging knowledge of regulatory roles of d-amino acids in bacteria ». In : *Cell. Mol. Life Sci.* 68.5, p. 817–831. ISSN : 1420-682X. DOI : 10.1007/s00018-010-0571-8.
- CHANDLER, M S et D A MORRISON (1987). « Competence for genetic transformation in Streptococcus pneumoniae : molecular cloning of com, a competence control locus. » In : *J. Bacteriol.* 169.5, p. 2005–11. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/JB.169.5.2005-2011.1987.
- CHANG, James D. et al. (2017a). « Inhibition of *Staphylococcus aureus* cell wall biosynthesis by desleucyl-oritavancin : a quantitative peptidoglycan composition analysis by mass spectrometry ». In : *J. Bacteriol.* JB.00278–17. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/JB.00278-17.
- CHANG, James D et al. (2017b). « Peptidoglycan O-acetylation increases in response to vancomycin treatment in vancomycin-resistant Enterococcus faecalis. » In : *Sci. Rep.* 7, p. 46500. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/srep46500.
- CHAPOT-CHARTIER, Marie-Pierre et Saulius KULAKAUSKAS (2014). « Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. » In : *Microb. Cell Fact.* 13 Suppl 1.Suppl 1, S9. ISSN : 1475-2859. DOI : 10.1186/1475-2859-13-S1-S9.
- CHO, Hongbaek et al. (2016). « Bacterial cell wall biogenesis is mediated by SEDS and PBP polymerase families functioning semi-autonomously ». In : *Nat. Microbiol.* 1.10, p. 16172. ISSN : 2058-5276. DOI : 10.1038/nmicrobiol.2016.172.
- CILLONIZ, Catia et al. (2016). « Microbial Etiology of Pneumonia : Epidemiology, Diagnosis and Resistance Patterns. » In : *Int. J. Mol. Sci.* 17.12. ISSN : 1422-0067. DOI : 10.3390/ijms17122120.
- CLARK, Emily L. et al. (2016). « Development of Rare Bacterial Monosaccharide Analogs for Metabolic Glycan Labeling in Pathogenic Bacteria ». In : *ACS*

- Chem. Biol.* 11.12, p. 3365–3373. ISSN : 1554-8929. DOI : 10.1021/acscchembio.6b00790.
- CLARK, S. E. et J. N. WEISER (2013). « Microbial Modulation of Host Immunity with the Small Molecule Phosphorylcholine ». In : *Infect. Immun.* 81.2, p. 392–401. ISSN : 0019-9567. DOI : 10.1128/IAI.01168-12.
- CLARKE, A J et C DUPONT (1992). « O-acetylated peptidoglycan : its occurrence, pathobiological significance, and biosynthesis. » In : *Can. J. Microbiol.* 38.2, p. 85–91. ISSN : 0008-4166.
- CLARKE, Anthony J., Hendrik STRATING et Neil T. BLACKBURN (2002). « Pathways for the O-Acetylation of Bacterial Cell Wall Polysaccharides ». In : *Glycomicrobiology*. Boston : Kluwer Academic Publishers, p. 187–223. DOI : 10.1007/0-306-46821-2\_7.
- CLAVERYS, Jean-Pierre et Leiv S. HÅVARSTEIN (2007). « Cannibalism and fratricide : mechanisms and raisons d'être ». In : *Nat. Rev. Microbiol.* 5.3, p. 219–229. ISSN : 1740-1526. DOI : 10.1038/nrmicro1613.
- CLAVERYS, Jean-Pierre, Bernard MARTIN et Leiv Sigve HÅVARSTEIN (2007). « Competence-induced fratricide in streptococci ». In : *Mol. Microbiol.* 64.6, p. 1423–1433. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2007.05757.x.
- CLAVERYS, Jean-Pierre et al. (2009). « The genetic transformation machinery : composition, localization, and mechanism ». In : *FEMS Microbiol. Rev.* 33.3, p. 643–656. ISSN : 1574-6976. DOI : 10.1111/j.1574-6976.2009.00164.x.
- COFFEY, T. J. et al. (1991). « Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae* ». In : *Mol. Microbiol.* 5.9, p. 2255–2260. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.1991.tb02155.x.
- CORSINI, Bruno et al. (2016). « Immunization with LytB protein of *Streptococcus pneumoniae* activates complement-mediated phagocytosis and induces protection against pneumonia and sepsis ». In : *Vaccine* 34.50, p. 6148–6157. ISSN : 18732518. DOI : 10.1016/j.vaccine.2016.11.001.
- CRISOSTOMO, MI et al. (2006). « Attenuation of penicillin resistance in a peptidoglycan O-acetyl transferase mutant of *Streptococcus pneumoniae* ». In : *Mol. Microbiol.* 61.6, p. 1497–1509. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2006.05340.x.
- CUNDELL, Diana R. et al. (1995). « *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor ». In : *Nature* 377.6548, p. 435–438. ISSN : 0028-0836. DOI : 10.1038/377435a0.

- DAMJANOVIC, Marlen et al. (2007). « The essential *tacF* gene is responsible for the choline-dependent growth phenotype of *Streptococcus pneumoniae*. » In : *J. Bacteriol.* 189.19, p. 7105–11. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/JB.00681-07.
- DAMMEYER, Thorben et Philip TINNEFELD (2012). « Engineered fluorescent proteins illuminate the bacterial periplasm. » In : *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 3.October, e201210013. ISSN : 2001-0370. DOI : 10.5936/csbj.201210013.
- DANIELS, Calvin C, P David ROGERS et Chasity M SHELTON (2016). « A Review of Pneumococcal Vaccines : Current Polysaccharide Vaccine Recommendations and Future Protein Antigens. » In : *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* 21.1, p. 27–35. ISSN : 1551-6776. DOI : 10.5863/1551-6776-21.1.27.
- DAVIS, Kimberly M. et Jeffrey N. WEISER (2011). « Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection ». In : *Infect. Immun.* 79.2, p. 562–570. ISSN : 00199567. DOI : 10.1128/IAI.00651-10.
- DAVIS, Kimberly M. et al. (2008). « Resistance to Mucosal Lysozyme Compensates for the Fitness Deficit of Peptidoglycan Modifications by *Streptococcus pneumoniae* ». In : *PLoS Pathog.* 4.12. Sous la dir. de Michael S. GILMORE, e1000241. ISSN : 1553-7374. DOI : 10.1371/journal.ppat.1000241.
- DE LAS RIVAS, Blanca et al. (2002). « Purification and polar localization of pneumococcal *LytB*, a putative endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase : The chain-dispersing murein hydrolase ». In : *J. Bacteriol.* 184.18, p. 4988–5000. ISSN : 00219193. DOI : 10.1128/JB.184.18.4988-5000.2002.
- D'ELIA, M. A. et al. (2006a). « Lesions in Teichoic Acid Biosynthesis in *Staphylococcus aureus* Lead to a Lethal Gain of Function in the Otherwise Dispensable Pathway ». In : *J. Bacteriol.* 188.12, p. 4183–4189. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/JB.00197-06.
- D'ELIA, Michael A et al. (2006b). « Wall teichoic acid polymers are dispensable for cell viability in *Bacillus subtilis*. » In : *J. Bacteriol.* 188.23, p. 8313–6. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/JB.01336-06.
- D'ELIA, Michael A. et al. (2009). « Probing Teichoic Acid Genetics with Bioactive Molecules Reveals New Interactions among Diverse Processes in Bacterial Cell Wall Biogenesis ». In : *Chem. Biol.* 16.5, p. 548–556. ISSN : 10745521. DOI : 10.1016/j.chembiol.2009.04.009.
- DENAPAITE, Dalia et al. (2012). « Biosynthesis of teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* and closely related species : lessons from genomes. » In : *Microb. Drug Resist.* 18.3, p. 344–58. ISSN : 1931-8448. DOI : 10.1089/mdr.2012.0026.
- DESAI, Bhushan V et Donald A MORRISON (2006). « An unstable competence-induced protein, *CoiA*, promotes processing of donor DNA after uptake during

- genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *J. Bacteriol.* 188.14, p. 5177–86. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/JB.00103-06.
- DI GUILMI, Anne Marie et al. (2002). « Bifunctional penicillin-binding proteins : focus on the glycosyltransferase domain and its specific inhibitor moenomycin. » In : *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3.2, p. 63–75. ISSN : 1389-2010.
- DIALLO, Amy et al. (2017). « Bacterial transformation : ComFA is a DNA-dependent ATPase that forms complexes with ComFC and DprA ». In : *Mol. Microbiol.* ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/mmi.13732.
- DINH, Thuy et Thomas G. BERNHARDT (2011). « Using superfolder green fluorescent protein for periplasmic protein localization studies ». In : *J. Bacteriol.* 193.18, p. 4984–4987. ISSN : 00219193. DOI : 10.1128/JB.00315-11.
- DOMENECH, Mirian et al. (2015). « In vitro biofilm development of *Streptococcus pneumoniae* and formation of choline-binding protein-DNA complexes ». In : *Environ. Microbiol. Rep.* 7.5, p. 715–727. ISSN : 17582229. DOI : 10.1111/1758-2229.12295.
- DONKOR, E S et al. (2011). « High levels of recombination among *Streptococcus pneumoniae* isolates from the Gambia. » In : *MBio* 2.3, e00040–11. ISSN : 2150-7511. DOI : 10.1128/mBio.00040-11.
- DOUGHERTY, T. J. (1983). « Peptidoglycan biosynthesis in *Neisseria gonorrhoeae* strains sensitive and intrinsically resistant to beta-lactam antibiotics ». In : *J. Bacteriol.* 153.1, p. 429–435. ISSN : 00219193.
- (1985). « Involvement of a change in penicillin target and peptidoglycan structure in low-level resistance to ??-lactam antibiotics in *Neisseria gonorrhoeae* ». In : *Antimicrob. Agents Chemother.* 28.1, p. 90–95. ISSN : 00664804. DOI : 10.1128/AAC.28.1.90.
- DRAING, Christian et al. (2006). « Comparison of Lipoteichoic Acid from Different Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* ». In : *J. Biol. Chem.* 281.45, p. 33849–33859. DOI : 10.1074/jbc.M602676200.
- DRAMSI, Shaynoor et al. (2008). « Covalent attachment of proteins to peptidoglycan ». In : *FEMS Microbiol. Rev.* 32.2, p. 307–320. ISSN : 1574-6976. DOI : 10.1111/j.1574-6976.2008.00102.x.
- DUMAN, Ramona et al. (2013). « Structural and genetic analyses reveal the protein SepF as a new membrane anchor for the Z ring. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110.48, E4601–10. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1313978110.
- DUMONT, Audrey et al. (2012). « Click-mediated labeling of bacterial membranes through metabolic modification of the lipopolysaccharide inner core. » In : *An-*

- gew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51.13, p. 3143–6. ISSN : 1521-3773. DOI : 10.1002/anie.201108127.
- EBERHARDT, Alice et al. (2009). « Cellular localization of choline-utilization proteins in *Streptococcus pneumoniae* using novel fluorescent reporter systems ». In : *Mol. Microbiol.* 74.2, p. 395–408. ISSN : 1365-2958. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2009.06872.x.
- EBERHARDT, Alice et al. (2012). « Attachment of Capsular Polysaccharide to the Cell Wall in *Streptococcus pneumoniae* ». In : *Microb. Drug Resist.* 18.3, p. 240–255. ISSN : 1076-6294. DOI : 10.1089/mdr.2011.0232.
- EGAN, Alexander J. F. et Waldemar VOLLMER (2013). « The physiology of bacterial cell division ». In : *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1277.1, p. 8–28. ISSN : 00778923. DOI : 10.1111/j.1749-6632.2012.06818.x.
- EGAN, Alexander J. F. et al. (2015). « Activities and regulation of peptidoglycan synthases ». In : *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370.1679, p. 20150031. ISSN : 0962-8436. DOI : 10.1098/rstb.2015.0031.
- EGAN, Alexander J. F. et al. (2016). « Regulation of bacterial cell wall growth ». In : *FEBS J.* 284.6, p. 851–867. ISSN : 1742464X. DOI : 10.1111/febs.13959.
- ELDHOLM, Vegard et al. (2009). « Fratricide in *Streptococcus pneumoniae* : Contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC ». In : *Microbiology* 155.7, p. 2223–2234. ISSN : 13500872. DOI : 10.1099/mic.0.026328-0.
- ELDHOLM, Vegard et al. (2010). « Pneumococcal CbpD is a murein hydrolase that requires a dual cell envelope binding specificity to kill target cells during fratricide ». In : *Mol. Microbiol.* 76.4, p. 905–917. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2010.07143.x.
- EMAMI, Kaveh et al. (2017). « RodA as the missing glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* and antibiotic discovery for the peptidoglycan polymerase pathway ». In : *Nat. Microbiol.* 2, p. 16253. ISSN : 2058-5276. DOI : 10.1038/nmicrobiol.2016.253.
- ESSER, R E et al. (1985). « Reactivation of streptococcal cell wall-induced arthritis by homologous and heterologous cell wall polymers. » In : *Arthritis Rheum.* 28.12, p. 1402–11. ISSN : 0004-3591.
- FABRETTI, F. et al. (2006). « Alanine Esters of Enterococcal Lipoteichoic Acid Play a Role in Biofilm Formation and Resistance to Antimicrobial Peptides ». In : *Infect. Immun.* 74.7, p. 4164–4171. ISSN : 0019-9567. DOI : 10.1128/IAI.00111-06.



- FADDA, Daniela et al. (2003). « Characterization of divIVA and other genes located in the chromosomal region downstream of the dcw cluster in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *J. Bacteriol.* 185.20, p. 6209–14. ISSN : 0021-9193.
- FADDA, Daniela et al. (2007). « *Streptococcus pneumoniae* DivIVA : Localization and interactions in a MinCD-free context ». In : *J. Bacteriol.* T. 189. 4, p. 1288–1298. ISBN : 3907067584. DOI : 10.1128/JB.01168-06.
- FALK, Shaun P. et Bernard WEISBLUM (2013). « Phosphorylation of the *Streptococcus pneumoniae* cell wall biosynthesis enzyme MurC by a eukaryotic-like Ser/Thr kinase ». In : *FEMS Microbiol. Lett.* 340.1, p. 19–23. ISSN : 03781097. DOI : 10.1111/1574-6968.12067.
- FANI, Fereshteh et al. (2014). « Genomic analyses of DNA transformation and penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. » In : *Antimicrob. Agents Chemother.* 58.3, p. 1397–403. ISSN : 1098-6596. DOI : 10.1128/AAC.01311-13.
- FELDMAN, Charles et Ronald ANDERSON (2016). « Epidemiology, virulence factors and management of the pneumococcus ». In : *F1000Research* 5, p. 2320. ISSN : 2046-1402. DOI : 10.12688/f1000research.9283.1.
- FENTON, Andrew K. et al. (2016). « CozE is a member of the MreCD complex that directs cell elongation in *Streptococcus pneumoniae* ». In : *Nat. Microbiol.* 2, p. 16237. ISSN : 2058-5276. DOI : 10.1038/nmicrobiol.2016.237.
- FERNÁNDEZ-TORNERO, C et al. (2001). « A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. » In : *Nat. Struct. Biol.* 8.12, p. 1020–1024. ISSN : 1072-8368. DOI : 10.1038/nsb724.
- FERNÁNDEZ-TORNERO, Carlos et al. (2002). « Two New Crystal Forms of the Choline-binding Domain of the Major Pneumococcal Autolysin : Insights into the Dynamics of the Active Homodimer ». In : *J. Mol. Biol.* 321.1, p. 163–173. ISSN : 00222836. DOI : 10.1016/S0022-2836(02)00596-X.
- FILIBE, S R et A TOMASZ (2000). « Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall mucopeptide branching genes. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97.9, p. 4891–6. ISSN : 0027-8424. DOI : 10.1073/pnas.080067697.
- FISCHER, H et A TOMASZ (1984). « Production and release of peptidoglycan and wall teichoic acid polymers in pneumococci treated with beta-lactam antibiotics. » In : *J. Bacteriol.* 157.2, p. 507–13. ISSN : 0021-9193.
- FISCHER, W et al. (1993). « Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures. A reinvestigation of teichoid acid (C polysaccharide). » In : *Eur. J. Biochem.* 215.3, p. 851–7. ISSN : 0014-2956.

- FLEMING, T J, D E WALLSMITH et R S ROSENTHAL (1986). « Arthropathic properties of gonococcal peptidoglycan fragments : implications for the pathogenesis of disseminated gonococcal disease. » In : *Infect. Immun.* 52.2, p. 600–8. ISSN : 0019-9567.
- FLEURIE, Aurore et al. (2012). « Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae* ». In : *Mol. Microbiol.* 83.4, p. 746–758. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2011.07962.x.
- FLEURIE, Aurore et al. (2014a). « Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. » In : *PLoS Genet.* 10.4, e1004275. ISSN : 1553-7404. DOI : 10.1371/journal.pgen.1004275.
- FLEURIE, Aurore et al. (2014b). « MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae* ». In : *Nature* 516.7530, p. 259–262. ISSN : 0028-0836. DOI : 10.1038/nature13966.
- FORMSTONE, Alex et al. (2008). « Localization and interactions of teichoic acid synthetic enzymes in *Bacillus subtilis*. » In : *J. Bacteriol.* 190.5, p. 1812–21. ISSN : 1098-5530. DOI : 10.1128/JB.01394-07.
- FOX, A et al. (1982). « Arthropathic properties related to the molecular weight of peptidoglycan-polysaccharide polymers of streptococcal cell walls. » In : *Infect. Immun.* 35.3, p. 1003–10. ISSN : 0019-9567.
- FRIRDICH, Emilisa et Erin C GAYNOR (2013). « Peptidoglycan hydrolases, bacterial shape, and pathogenesis ». In : *Curr. Opin. Microbiol.* 16.6, p. 767–778. ISSN : 13695274. DOI : 10.1016/j.mib.2013.09.005.
- FROLET, Cécile et al. (2010). « New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins ». In : *BMC Microbiol.* 10.1, p. 190. ISSN : 1471-2180. DOI : 10.1186/1471-2180-10-190.
- GARAU, Gianpiero et al. (2005). « Crystal structure of phosphorylcholine esterase domain of the virulence factor choline-binding protein E from *Streptococcus pneumoniae* : New structural features among the metallo- $\beta$ -lactamase superfamily ». In : *J. Biol. Chem.* 280.31, p. 28591–28600. ISSN : 00219258. DOI : 10.1074/jbc.M502744200.
- GARCÍA, E et al. (1985). « Cloning and expression of the pneumococcal autolysin gene in *Escherichia coli*. » In : *Mol. Gen. Genet.* 201.2, p. 225–30. ISSN : 0026-8925.

- GARCÍA, E et al. (1988). « Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85.3, p. 914–8. ISSN : 0027-8424.
- GARCIA, P. et al. (1999). « LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation ». In : *Mol. Microbiol.* 31.4, p. 1275–1277. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1046/j.1365-2958.1999.01238.x.
- GARCIA-BUSTOS, J F, B T CHAIT et A TOMASZ (1987). « Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. » In : *J. Biol. Chem.* 262.32, p. 15400–5. ISSN : 0021-9258.
- GAUTAM, Samir et al. (2013). « Exterior design : strategies for redecorating the bacterial surface with small molecules. » In : *Trends Biotechnol.* 31.4, p. 258–67. ISSN : 1879-3096. DOI : 10.1016/j.tibtech.2013.01.012.
- GAUTAM, Samir et al. (2015). « An Activity-Based Probe for Studying Crosslinking in Live Bacteria ». In : *Angew. Chemie Int. Ed.* 54.36, p. 10492–10496. ISSN : 14337851. DOI : 10.1002/anie.201503869.
- GAUTAM, Samir et al. (2016). « Wall teichoic acids prevent antibody binding to epitopes within the cell wall of *Staphylococcus aureus* ». In : *ACS Chem. Biol.* 11.1, p. 25–30. DOI : 10.1021/acschembio.5b00439.
- GEHRE, Florian et al. (2009). « Role of teichoic acid choline moieties in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. » In : *Infect. Immun.* 77.7, p. 2824–31. ISSN : 1098-5522. DOI : 10.1128/IAI.00986-08.
- GEIGER, Otto, Isabel M. LÓPEZ-LARA et Christian SOHLENKAMP (2013). « Phosphatidylcholine biosynthesis and function in bacteria ». In : *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1831.3, p. 503–513. ISSN : 13881981. DOI : 10.1016/j.bbalip.2012.08.009.
- GENO, K Aaron et al. (2015). « Pneumococcal Capsules and Their Types : Past, Present, and Future. » In : *Clin. Microbiol. Rev.* 28.3, p. 871–99. ISSN : 1098-6618. DOI : 10.1128/CMR.00024-15.
- GIEFING, Carmen et al. (2010). « The pneumococcal eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP co-localizes with the cell division apparatus and interacts with FtsZ in vitro. » In : *Microbiology* 156.Pt 6, p. 1697–707. ISSN : 1465-2080. DOI : 10.1099/mic.0.036335-0.
- GIEFING-KROLL, C. et al. (2011). « Absence of pneumococcal PcsB is associated with overexpression of LysM domain-containing proteins ». In : *Microbiology* 157.7, p. 1897–1909. ISSN : 1350-0872. DOI : 10.1099/mic.0.045211-0.
- GISCH, Nicolas et al. (2013). « Structural reevaluation of *Streptococcus pneumoniae* Lipoteichoic acid and new insights into its immunostimulatory potency. » In : *J.*

- Biol. Chem.* 288.22, p. 15654–67. ISSN : 1083-351X. DOI : 10.1074/jbc.M112.446963.
- GISCH, Nicolas et al. (2015). « Lipoteichoic acid of *Streptococcus oralis* Uo5 : a novel biochemical structure comprising an unusual phosphorylcholine substitution pattern compared to *Streptococcus pneumoniae* ». In : *Sci. Rep.* 5.October, p. 16718. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/srep16718.
- GOEBEL, W F et O T AVERY (1929). « A STUDY OF PNEUMOCOCCUS AUTO-LYSIS. » In : *J. Exp. Med.* 49.2, p. 267–86. ISSN : 0022-1007.
- GONZÁLEZ, Ana et al. (2008). « Mutations in the *tacF* gene of clinical strains and laboratory transformants of *Streptococcus pneumoniae* : impact on choline auxotrophy and growth rate. » In : *J. Bacteriol.* 190.12, p. 4129–38. ISSN : 1098-5530. DOI : 10.1128/JB.01991-07.
- GORDON, E. et al. (2000). « The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form : implication in drug resistance 1 1Edited by R. Huber ». In : *J. Mol. Biol.* 299.2, p. 477–485. ISSN : 00222836. DOI : 10.1006/jmbi.2000.3740.
- GOSINK, K. K. et al. (2000). « Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae* ». In : *Infect. Immun.* 68.10, p. 5690–5695. ISSN : 00199567. DOI : 10.1128/IAI.68.10.5690-5695.2000.
- GRANGEASSE, Christophe (2016). « Rewiring the Pneumococcal Cell Cycle with Serine/Threonine- and Tyrosine-kinases ». In : *Trends Microbiol.* 24.9, p. 713–724. ISSN : 0966842X. DOI : 10.1016/j.tim.2016.04.004.
- GREBE, T et R HAKENBECK (1996). « Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. » In : *Antimicrob. Agents Chemother.* 40.4, p. 829–34. ISSN : 0066-4804.
- GREENE, Neil G. et al. (2015). « Peptidoglycan Branched Stem Peptides Contribute to *Streptococcus pneumoniae* Virulence by Inhibiting Pneumolysin Release ». In : *PLoS Pathog.* 11.6. Sous la dir. de Carlos Javier ORIHUELA, e1004996. ISSN : 1553-7374. DOI : 10.1371/journal.ppat.1004996.
- GREVE, T. et J. K. MOLLER (2012). « Accuracy of using the *lytA* gene to distinguish *Streptococcus pneumoniae* from related species ». In : *J. Med. Microbiol.* 61.Pt\_4, p. 478–482. ISSN : 0022-2615. DOI : 10.1099/jmm.0.036574-0.
- GRIFFITH, F (1928). « The Significance of Pneumococcal Types. » In : *J. Hyg. (Lond).* 27.2, p. 113–59. ISSN : 0022-1724.

- GRÜNDLING, Angelika et Olaf SCHNEEWIND (2007). « Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104.20, p. 8478–83. ISSN : 0027-8424. DOI : 10.1073/pnas.0701821104.
- GUIRAL, Sébastien et al. (2005). « Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae* : genetic requirements. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102.24, p. 8710–5. ISSN : 0027-8424. DOI : 10.1073/pnas.0500879102.
- GÜNDOĞDU, Muhammet E et al. (2011). « Large ring polymers align FtsZ polymers for normal septum formation. » In : *EMBO J.* 30.3, p. 617–26. ISSN : 1460-2075. DOI : 10.1038/emboj.2010.345.
- HA, Reuben et al. (2016). « Accumulation of Peptidoglycan O-Acetylation Leads to Altered Cell Wall Biochemistry and Negatively Impacts Pathogenesis Factors of *Campylobacter jejuni*. » In : *J. Biol. Chem.* 291.43, p. 22686–22702. ISSN : 1083-351X. DOI : 10.1074/jbc.M116.746404.
- HAKENBECK, R, S TORNETTE et N F ADKINSON (1987). « Interaction of non-lytic beta-lactams with penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* ». In : *J. Gen. Microbiol.* 133.3, p. 755–760. ISSN : 1350-0872. DOI : 10.1099/00221287-133-3-755.
- HAKENBECK, Regine et al. (2009). « Versatility of choline metabolism and choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci ». In : *FEMS Microbiol. Rev.* 33.3, p. 572–586. ISSN : 01686445. DOI : 10.1111/j.1574-6976.2009.00172.x.
- HAKENBECK, Regine et al. (2012). « Molecular mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* ». In : *Future Microbiol.* 7.3, p. 395–410. ISSN : 1746-0913. DOI : 10.2217/fmb.12.2.
- HAMERMAN, D (1966). « New thoughts on the pathogenesis of rheumatoid arthritis ». In : *Am. J. Med.* 40.1.
- HANSMAN, D et G ANDREWS (1967). « Hospital infection with pneumococci resistant to tetracycline. » In : *Med. J. Aust.* 1.10, p. 498–501. ISSN : 0025-729X.
- HARRINGTON, Dean J. et Iain C. SUTCLIFFE (2002). « Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes ». In : *Microbiology* 148.7, p. 2065–2077. ISSN : 1350-0872. DOI : 10.1099/00221287-148-7-2065.
- HAVA, David L. et Andrew CAMILLI (2002). « Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors ». In : *Mol. Microbiol.* 45.5, p. 1389–1406. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1046/j.1365-2958.2002.03106.x.

- HÅVARSTEIN, L S, G COOMARASWAMY et D A MORRISON (1995). « An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92.24, p. 11140–4. ISSN : 0027-8424.
- HÅVARSTEIN, Leiv Sigve et al. (1996). « Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor ». In : *Mol. Microbiol.* 21.4, p. 863–869. DOI : 10.1046/j.1365-2958.1996.521416.x.
- HAVARSTEIN, Leiv Sigve et al. (2006). « New insights into the pneumococcal fratricide : relationship to clumping and identification of a novel immunity factor ». In : *Mol. Microbiol.* 59.4, p. 1297–1037. ISSN : 0950-382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2005.05021.x.
- HÉBERT, Laurent et al. (2007). « *Enterococcus faecalis* constitutes an unusual bacterial model in lysozyme resistance. » In : *Infect. Immun.* 75.11, p. 5390–8. ISSN : 0019-9567. DOI : 10.1128/IAI.00571-07.
- HERGOTT, Christopher B. et al. (2015). « Bacterial exploitation of phosphorylcholine mimicry suppresses inflammation to promote airway infection ». In : *J. Clin. Invest.* 125.10, p. 3878–3890. ISSN : 0021-9738. DOI : 10.1172/JCI81888.
- HERMOSO, Juan a et al. (2005). « Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. » In : *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12.6, p. 533–8. ISSN : 1545-9993. DOI : 10.1038/nsmb940.
- HIGGINS, M L et G D SHOCKMAN (1976). « Study of cycle of cell wall assembly in *Streptococcus faecalis* by three-dimensional reconstructions of thin sections of cells. » In : *J. Bacteriol.* 127.3, p. 1346–58. ISSN : 0021-9193.
- HIGUCHI, R, B KRUMMEL et R K SAIKI (1988). « A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments : study of protein and DNA interactions. » In : *Nucleic Acids Res.* 16.15, p. 7351–67. ISSN : 0305-1048.
- HIRST, R A et al. (2004). « The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. » In : *Clin. Exp. Immunol.* 138.2, p. 195–201. ISSN : 0009-9104. DOI : 10.1111/j.1365-2249.2004.02611.x.
- HIRST, Robert A. et al. (2008). « *Streptococcus pneumoniae* Deficient in Pneumolysin or Autolysin Has Reduced Virulence in Meningitis ». In : *J. Infect. Dis.* 197.5, p. 744–751. ISSN : 0022-1899. DOI : 10.1086/527322.
- HOLEČKOVÁ, Nela et al. (2014). « LocZ is a new cell division protein involved in proper septum placement in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *MBio* 6.1, e01700–14. ISSN : 2150-7511. DOI : 10.1128/mBio.01700-14.

- HÖLTJE, J V et A TOMASZ (1974). « Teichoic acid phosphorylcholine esterase. A novel enzyme activity in pneumococcus. » In : *J. Biol. Chem.* 249.21, p. 7032–4. ISSN : 0021-9258.
- HOWARD, L. V. et H. GOODER (1974). « Specificity of the autolysin of *Streptococcus* (*Diplococcus*) *pneumoniae* ». In : *J. Bacteriol.* 117.2, p. 796–804. ISSN : 00219193.
- HOYLAND, Christopher N et al. (2014). « Structure of the LdcB LD-carboxypeptidase reveals the molecular basis of peptidoglycan recognition. » In : *Structure* 22.7, p. 949–60. ISSN : 1878-4186. DOI : 10.1016/j.str.2014.04.015.
- HSU, Yen-Pang et al. (2017). « Full color palette of fluorescent d -amino acids for in situ labeling of bacterial cell walls ». In : *Chem. Sci.* 8.9, p. 6313–6321. DOI : 10.1039/C7SC01800B.
- HUANG, Li-Li et al. (2013). « Enveloped virus labeling via both intrinsic biosynthesis and metabolic incorporation of phospholipids in host cells. » In : *Anal. Chem.* 85.10, p. 5263–70. ISSN : 1520-6882. DOI : 10.1021/ac4008144.
- HUDAK, Jason E. et al. (2017). « Illuminating vital surface molecules of symbionts in health and disease ». In : *Nat. Microbiol.* 2, p. 17099. ISSN : 2058-5276. DOI : 10.1038/nmicrobiol.2017.99.
- IWATA, Taketoshi et al. (2016). « Peptidoglycan Acetylation of *Campylobacter jejuni* Is Essential for Maintaining Cell Wall Integrity and Colonization in Chicken Intestines. » In : *Appl. Environ. Microbiol.* 82.20, p. 6284–6290. ISSN : 1098-5336. DOI : 10.1128/AEM.02068-16.
- JACQ, Maxime et al. (2015). « Remodeling of the Z-Ring Nanostructure during the *Streptococcus pneumoniae* Cell Cycle Revealed by Photoactivated Localization Microscopy. » In : *MBio* 6.4. ISSN : 2150-7511. DOI : 10.1128/mBio.01108-15.
- JAO, C. Y. et al. (2009). « Metabolic labeling and direct imaging of choline phospholipids in vivo ». In : *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106.36, p. 15332–15337. ISSN : 0027-8424. DOI : 10.1073/pnas.0907864106.
- JENSEN, Anders et al. (2015). « Commensal streptococci serve as a reservoir for  $\beta$ -lactam resistance genes in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *Antimicrob. Agents Chemother.* 59.6, p. 3529–40. ISSN : 1098-6596. DOI : 10.1128/AAC.00429-15.
- JOHNSBORG, Ola, Vegard ELDHOLM et Leiv Sigve HÅVARSTEIN (2007). « Natural genetic transformation : prevalence, mechanisms and function ». In : *Res. Microbiol.* 158.10, p. 767–778. ISSN : 09232508. DOI : 10.1016/j.resmic.2007.09.004.
- JOHNSBORG, Ola et Leiv Sigve HÅVARSTEIN (2009). « Pneumococcal LytR, a protein from the LytR-CpsA-Psr family, is essential for normal septum formation in

- Streptococcus pneumoniae. » In : *J. Bacteriol.* 191.18, p. 5859–64. ISSN : 1098-5530. DOI : 10.1128/JB.00724-09.
- JOHNSBORG, Ola et al. (2008). « A predatory mechanism dramatically increases the efficiency of lateral gene transfer in *Streptococcus pneumoniae* and related commensal species ». In : *Mol. Microbiol.* 69.1, p. 245–253. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2008.06288.x.
- JOHNSTON, Calum et al. (2014a). « Bacterial transformation : distribution, shared mechanisms and divergent control. » In : *Nat. Rev. Microbiol.* 12.3, p. 181–96. ISSN : 1740-1534. DOI : 10.1038/nrmicro3199.
- JOHNSTON, Calum et al. (2014b). *Streptococcus pneumoniae, le transformiste*. DOI : 10.1016/j.tim.2014.01.002.
- JOHNSTON, Calum et al. (2016). « Fine-tuning of choline metabolism is important for pneumococcal colonization ». In : *Mol. Microbiol.* 100.6, p. 972–988. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/mmi.13360.
- JONES, L J, R CARBALLIDO-LÓPEZ et J ERRINGTON (2001). « Control of cell shape in bacteria : helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. » In : *Cell* 104.6, p. 913–22. ISSN : 0092-8674.
- JONG, Imke G de et al. (2011). « Live Cell Imaging of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae* using Automated Time-lapse Microscopy. » In : *J. Vis. Exp.* 53. ISSN : 1940-087X. DOI : 10.3791/3145.
- KARLSSON, Camilla, Per Erik JANSSON et Uffe B. SKOV SØRENSEN (1999). « The pneumococcal common antigen C-polysaccharide occurs in different forms : Mono-substituted or di-substituted with phosphocholine ». In : *Eur. J. Biochem.* 265.3, p. 1091–1097. ISSN : 00142956. DOI : 10.1046/j.1432-1327.1999.00835.x.
- KASAHARA, Jun et al. (2016). « Teichoic Acid Polymers Affect Expression and Localization of dl-Endopeptidase LytE Required for Lateral Cell Wall Hydrolysis in *Bacillus subtilis* ». In : *J. Bacteriol.* 198.11. Sous la dir. de T. M. HENKIN, p. 1585–1594. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/JB.00003-16.
- KAUSMALLY, Louise et al. (2005). « Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis. » In : *J. Bacteriol.* 187.13, p. 4338–45. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/JB.187.13.4338-4345.2005.
- KELE, Péter et al. (2009). « Dual Labeling of Biomolecules by Using Click Chemistry : A Sequential Approach ». In : *Angew. Chemie Int. Ed.* 48.2, p. 344–347. ISSN : 14337851. DOI : 10.1002/anie.200804514.



- KELLER, Lance E., D. Ashley ROBINSON et Larry S. MCDANIEL (2016). « Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* : Emergence and Pathogenesis ». In : *MBio* 7.2, e01792–15. DOI : 10.1128/mBio.01792-15.
- KHAN, Naeem et Arif T JAN (2017). « Towards Identifying Protective B-Cell Epitopes : The PspA Story. » In : *Front. Microbiol.* 8, p. 742. DOI : 10.3389/fmicb.2017.00742.
- KHARAT, Arun S. et Alexander TOMASZ (2006). « Drastic reduction in the virulence of *Streptococcus pneumoniae* expressing type 2 capsular polysaccharide but lacking choline residues in the cell wall ». In : *Mol. Microbiol.* 60.1, p. 93–107. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2006.05082.x.
- KHARAT, Arun S et al. (2008). « Different pathways of choline metabolism in two choline-independent strains of *Streptococcus pneumoniae* and their impact on virulence. » In : *J. Bacteriol.* 190.17, p. 5907–14. ISSN : 1098-5530. DOI : 10.1128/JB.00628-08.
- KHARE, Baldeep et Sthanam V. L. NARAYANA (2017). « Pilus biogenesis of Gram-positive bacteria : Roles of sortases and implications for assembly ». In : *Protein Sci.* ISSN : 09618368. DOI : 10.1002/pro.3191.
- KIETZMAN, Colin C. et al. (2016). « Dynamic capsule restructuring by the main pneumococcal autolysin LytA in response to the epithelium ». In : *Nat. Commun.* 7, p. 10859. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/ncomms10859.
- KILIAN, Mogens et al. (2008). « Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and Its Close Commensal Relatives ». In : *PLoS One* 3.7. Sous la dir. de Niyaz AHMED, e2683. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0002683.
- KIM, J O et J N WEISER (1998). « Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. » In : *J. Infect. Dis.* 177.2, p. 368–77. ISSN : 0022-1899.
- KIM, Lindsay et al. (2016). « Biological and Epidemiological Features of Antibiotic-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Pre- and Post-Conjugate Vaccine Eras : a United States Perspective ». In : *Clin. Microbiol. Rev.* 29.3, p. 525–552. ISSN : 0893-8512. DOI : 10.1128/CMR.00058-15.
- KIRIYAMA, Yuuka et al. (2014). « Localization and expression of the *Bacillus subtilis* DL-endopeptidase LytF are influenced by mutations in LTA synthases and glycolipid anchor synthetic enzymes. » In : *Microbiology* 160.Pt 12, p. 2639–49. ISSN : 1465-2080. DOI : 10.1099/mic.0.080366-0.
- KOCAOGLU, Ozden et Erin E CARLSON (2016). « Progress and prospects for small-molecule probes of bacterial imaging ». In : *Nat. Chem. Biol.* 12.7, p. 472–478. ISSN : 1552-4450. DOI : 10.1038/nchembio.2109.

- KOCAOGLU, Ozden et al. (2015). « Profiling of  $\beta$ -lactam selectivity for penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* D39. » In : *Antimicrob. Agents Chemother.* 59.6, p. 3548–55. ISSN : 1098-6596. DOI : 10.1128/AAC.05142-14.
- KOENIGS, Maria B, Elizabeth A RICHARDSON et Danielle H DUBE (2009). « Metabolic profiling of *Helicobacter pylori* glycosylation. » In : *Mol. Biosyst.* 5.9, p. 909–12. ISSN : 1742-2051. DOI : 10.1039/b902178g.
- KOGA, T et al. (1985). « Acute joint inflammation in mice after systemic injection of the cell wall, its peptidoglycan, and chemically defined peptidoglycan subunits from various bacteria. » In : *Infect. Immun.* 50.1, p. 27–34. ISSN : 0019-9567.
- KOLBE, Katharina et al. (2017). « Azido Pentoses : A New Tool To Efficiently Label *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates ». In : *ChemBioChem.* ISSN : 14394227. DOI : 10.1002/cbic.201600706.
- KOVÁCS, Márta et al. (2006). « A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *J. Bacteriol.* 188.16, p. 5797–805. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/JB.00336-06.
- KOVACS-SIMON, A, R W TITBALL et S L MICHELL (2011). « Lipoproteins of bacterial pathogens. » In : *Infect. Immun.* 79.2, p. 548–61. ISSN : 1098-5522. DOI : 10.1128/IAI.00682-10.
- KRAUSS, J et R HAKENBECK (1997). « A mutation in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3 of *Streptococcus pneumoniae* contributes to cefotaxime resistance of the laboratory mutant C604. » In : *Antimicrob. Agents Chemother.* 41.5, p. 936–42. ISSN : 0066-4804.
- KRUPKA, Marcin et al. (2014). « Role of the FtsA C terminus as a switch for polymerization and membrane association. » In : *MBio* 5.6, e02221. ISSN : 2150-7511. DOI : 10.1128/mBio.02221-14.
- KRUSE, Thomas, Jette BORK-JENSEN et Kenn GERDES (2004). « The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex ». In : *Mol. Microbiol.* 55.1, p. 78–89. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2004.04367.x.
- KURU, Erkin et al. (2012). « In Situ Probing of Newly Synthesized Peptidoglycan in Live Bacteria with Fluorescent D -Amino Acids ». In : *Angew. Chemie Int. Ed.* 51.50, p. 12519–12523. ISSN : 14337851. DOI : 10.1002/anie.201206749.
- KURU, Erkin et al. (2015). « Synthesis of fluorescent D-amino acids and their use for probing peptidoglycan synthesis and bacterial growth in situ. » In : *Nat. Protoc.* 10.1, p. 33–52. ISSN : 1750-2799. DOI : 10.1038/nprot.2014.197.

- LAABERKI, Maria Halima et al. (2011). « O-acetylation of peptidoglycan is required for proper cell separation and S-layer anchoring in *Bacillus anthracis* ». In : *J. Biol. Chem.* 286.7, p. 5278–5288. ISSN : 00219258. DOI : 10.1074/jbc.M110.183236.
- LACKS, S et M NEUBERGER (1975). « Membrane location of a deoxyribonuclease implicated in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. » In : *J. Bacteriol.* 124.3, p. 1321–9. ISSN : 0021-9193.
- LACKS, Sanford et Rollin D. HOTCHKISS (1960). « A study of the genetic material determining an enzyme activity in *Pneumococcus* ». In : *Biochim. Biophys. Acta* 39.3, p. 508–518. ISSN : 00063002. DOI : 10.1016/0006-3002(60)90205-5.
- LAGARTERA, Laura et al. (2005). « Pneumococcal phosphorylcholine esterase, Pce, contains a metal binuclear center that is essential for substrate binding and catalysis. » In : *Protein Sci.* 14.12, p. 3013–24. ISSN : 0961-8368. DOI : 10.1110/ps.051575005.
- LAND, Adrian D. et al. (2013). « Requirement of essential Pbp2x and GpsB for septal ring closure in *Streptococcus pneumoniae* D39 ». In : *Mol. Microbiol.* 90.5, p. 939–955. DOI : 10.1111/mmi.12408.
- LANG, Kathrin et Jason W. CHIN (2014). « Bioorthogonal Reactions for Labeling Proteins ». In : *ACS Chem. Biol.* 9.1, p. 16–20. ISSN : 1554-8929. DOI : 10.1021/cb4009292.
- LARSON, Thomas R. et Janet YOTHER (2017). « *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide is linked to peptidoglycan via a direct glycosidic bond to  $\beta$ -D-*N*-acetylglucosamine ». In : *Proc. Natl. Acad. Sci. P.* 201620431. ISSN : 0027-8424. DOI : 10.1073/pnas.1620431114.
- LAURENCEAU, Raphaël et al. (2013). « A Type IV Pilus Mediates DNA Binding during Natural Transformation in *Streptococcus pneumoniae* ». In : *PLoS Pathog.* 9.6. Sous la dir. de Carlos Javier ORIHUELA, e1003473. ISSN : 1553-7374. DOI : 10.1371/journal.ppat.1003473.
- LI, Caishun et al. (2014). « Practical labeling methodology for choline-derived lipids and applications in live cell fluorescence imaging. » In : *Photochem. Photobiol.* 90.3, p. 686–95. ISSN : 1751-1097. DOI : 10.1111/php.12234.
- LI, Jie et Peng R CHEN (2016). « Development and application of bond cleavage reactions in bioorthogonal chemistry. » In : *Nat. Chem. Biol.* 12.3, p. 129–37. ISSN : 1552-4469. DOI : 10.1038/nchembio.2024.
- LI, Li et Zhiyuan ZHANG (2016). « Development and Applications of the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) as a Bioorthogonal Reaction ». In : *Molecules* 21.10, p. 1393. ISSN : 1420-3049. DOI : 10.3390/molecules21101393.

- LI, Qiong et al. (2015). « Full-length structure of the major autolysin LytA ». In : *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 71, p. 1373–1381. ISSN : 13990047. DOI : 10.1107/S1399004715007403.
- LIANG, Hai et al. (2017). « Metabolic labelling of the carbohydrate core in bacterial peptidoglycan and its applications ». In : *Nat. Commun.* 8, p. 15015. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/ncomms15015.
- LIU, Feng et al. (2009). « The engineering of bacteria bearing azido-pseudaminic acid-modified flagella. » In : *Chembiochem* 10.8, p. 1317–20. ISSN : 1439-7633. DOI : 10.1002/cbic.200900018.
- LIU, Xue et al. (2017). « High-throughput CRISPRi phenotyping identifies new essential genes in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *Mol. Syst. Biol.* 13.5, p. 931. ISSN : 1744-4292.
- LÖFLING, J. et al. (2011). « Cellular interactions by LPxTG-anchored pneumococcal adhesins and their streptococcal homologues ». In : *Cell. Microbiol.* 13.2, p. 186–197. ISSN : 14625814. DOI : 10.1111/j.1462-5822.2010.01560.x.
- LÓPEZ, Rubens et al. (2000). « Biological roles of two new murein hydrolases of *Streptococcus pneumoniae* representing examples of module shuffling ». In : *Res. Microbiol.* T. 151. 6, p. 437–443. ISBN : 0923250800001. DOI : 10.1016/S0923-2508(00)00172-8.
- LUNDERBERG, J Mark et al. (2013). « *Bacillus anthracis* acetyltransferases PatA1 and PatA2 modify the secondary cell wall polysaccharide and affect the assembly of S-layer proteins. » In : *J. Bacteriol.* 195.5, p. 977–89. ISSN : 1098-5530. DOI : 10.1128/JB.01274-12.
- MACHEBOEUF, P. et al. (2005). « Active site restructuring regulates ligand recognition in class A penicillin-binding proteins ». In : *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102.3, p. 577–582. ISSN : 0027-8424. DOI : 10.1073/pnas.0407186102.
- MACHEBOEUF, Pauline et al. (2006). « Penicillin Binding Proteins : key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes ». In : *FEMS Microbiol. Rev.* 30.5, p. 673–691. ISSN : 1574-6976. DOI : 10.1111/j.1574-6976.2006.00024.x.
- MADHOUR, A., P. MAURER et R. HAKENBECK (2011). « Cell surface proteins in *S. pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis* ». In : *Iran. J. Microbiol.* 3.2, p. 58–67. ISSN : 20083289.
- MAESTRO, Beatriz et Jesús M SANZ (2016). « Choline Binding Proteins from *Streptococcus pneumoniae* : A Dual Role as Enzybiotics and Targets for the Design of New Antimicrobials. » In : *Antibiot. (Basel, Switzerland)* 5.2. DOI : 10.3390/antibiotics5020021.

- MAESTRO, Beatriz et al. (2011). « Recognition of peptidoglycan and  $\beta$ -lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae* ». In : *FEBS Lett.* 585.2, p. 357–363. ISSN : 00145793. DOI : 10.1016/j.febslet.2010.12.016. arXiv : NIHMS150003.
- MAINARDI, Jean-Luc et al. (2008). « Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria ». In : *FEMS Microbiol. Rev.* 32.2, p. 386–408. ISSN : 1574-6976. DOI : 10.1111/j.1574-6976.2007.00097.x.
- MANN, B et al. (2006). « Multifunctional role of choline binding protein G in pneumococcal pathogenesis. » In : *Infect. Immun.* 74.2, p. 821–9. ISSN : 0019-9567. DOI : 10.1128/IAI.74.2.821-829.2006.
- MANUSE, Sylvie et al. (2016). « Structure-function analysis of the extracellular domain of the pneumococcal cell division site positioning protein MapZ. » In : *Nat. Commun.* 7, p. 12071. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/ncomms12071.
- MARSHALL, Jamie E. et al. (2015). « The Crystal Structure of Pneumolysin at 2.0 Å Resolution Reveals the Molecular Packing of the Pre-pore Complex ». In : *Sci. Rep.* 5.1, p. 13293. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/srep13293.
- MARTEYN, Benoit S. et al. (2014). « ZapE is a novel cell division protein interacting with FtsZ and modulating the Z-ring dynamics ». In : *MBio* 5.2. ISSN : 21507511. DOI : 10.1128/mBio.00022-14.
- MARTÍN, A C, R LÓPEZ et P GARCÍA (1998). « Functional analysis of the two-gene lysis system of the pneumococcal phage Cp-1 in homologous and heterologous host cells. » In : *J. Bacteriol.* 180.2, p. 210–7. ISSN : 0021-9193.
- MARTIN, Hans Herbert et Jobst GMEINER (1979). « Modification of Peptidoglycan Structure by Penicillin Action in Cell Walls of *Proteus mirabilis* ». In : *Eur. J. Biochem.* 95.3, p. 487–495. ISSN : 0014-2956. DOI : 10.1111/j.1432-1033.1979.tb12988.x.
- MARTÍNEZ, Beatriz et al. (2007). « Cell envelope stress induced by the bacteriocin Lcn972 is sensed by the Lactococcal two-component system CesSR. » In : *Mol. Microbiol.* 64.2, p. 473–86. ISSN : 0950-382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2007.05668.x.
- MARTNER, Anna et al. (2008). « Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils ». In : *Infect. Immun.* 76.9, p. 4079–4087. ISSN : 00199567. DOI : 10.1128/IAI.01747-07.

- MARTNER, Anna et al. (2009). « Streptococcus pneumoniae autolysis prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines ». In : *Infect. Immun.* 77.9, p. 3826–3837. ISSN : 00199567. DOI : 10.1128/IAI.00290-09.
- MASSIDDA, O. et al. (1998). « Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of Streptococcus pneumoniae ». In : *Microbiology* 144.11, p. 3069–3078. ISSN : 1350-0872. DOI : 10.1099/00221287-144-11-3069.
- MASSIDDA, Orietta, Linda NOVÁKOVÁ et Waldemar VOLLMER (2013). « From models to pathogens : how much have we learned about <i>Streptococcus pneumoniae</i> cell division ? » In : *Environ. Microbiol.* 15.12, p. 3133–3157. ISSN : 14622912. DOI : 10.1111/1462-2920.12189.
- MASPONS, Jordi et al. (2014). « Identification of Living <i>Legionella pneumophila</i> Using Species-Specific Metabolic Lipopolysaccharide Labeling ». In : *Angew. Chemie Int. Ed.* 53.5, p. 1275–1278. ISSN : 14337851. DOI : 10.1002/anie.201309072.
- MCKAY, Craig S et M G FINN (2014). « Click chemistry in complex mixtures : bioorthogonal bioconjugation. » In : *Chem. Biol.* 21.9, p. 1075–101. ISSN : 1879-1301. DOI : 10.1016/j.chembiol.2014.09.002.
- MCPHERSON, Derrell C et David L POPHAM (2003). « Peptidoglycan synthesis in the absence of class A penicillin-binding proteins in Bacillus subtilis. » In : *J. Bacteriol.* 185.4, p. 1423–31. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/jb.185.4.1423-1431.2003.
- MEESKE, Alexander J et al. (2016). « SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. » In : *Nature* 537.7622, p. 634–638. ISSN : 1476-4687. DOI : 10.1038/nature19331.
- MELLROTH, Peter et al. (2012). « LytA, major autolysin of Streptococcus pneumoniae, requires access to nascent peptidoglycan ». In : *J. Biol. Chem.* 287.14, p. 11018–11029. ISSN : 00219258. DOI : 10.1074/jbc.M111.318584.
- MELLROTH, Peter et al. (2014). « Structural and functional insights into peptidoglycan access for the lytic amidase LytA of Streptococcus pneumoniae ». In : *MBio* 5.1. ISSN : 21612129. DOI : 10.1128/mBio.01120-13.
- MEYRAND, M. et al. (2007). « Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylation decreases autolysis in Lactococcus lactis ». In : *Microbiology* 153.10, p. 3275–3285. ISSN : 1350-0872. DOI : 10.1099/mic.0.2007/005835-0.
- MINNEN, Anita et al. (2011). « SMC is recruited to oriC by ParB and promotes chromosome segregation in Streptococcus pneumoniae ». In : *Mol. Microbiol.* 81.3, p. 676–688. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2011.07722.x.

- MOHAMMADI, Tamimount et al. (2011). « Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane ». In : *EMBO J.* 30.8, p. 1425–1432. ISSN : 02614189. DOI : 10.1038/emboj.2011.61.
- MOLINA, Rafael et al. (2009). « Crystal structure of CbpF, a bifunctional choline-binding protein and autolysis regulator from *Streptococcus pneumoniae*. » In : *EMBO Rep.* 10.3, p. 246–51. ISSN : 1469-3178. DOI : 10.1038/embor.2008.245.
- MONTERROSO, Begoña et al. (2005). « Unravelling the structure of the pneumococcal autolytic lysozyme ». In : *Biochem. J.* 391.1, p. 41–49. ISSN : 0264-6021. DOI : 10.1042/BJ20050612.
- MORLOT, C. et al. (2013). « Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in *Streptococcus pneumoniae* R6 morphogenesis ». In : *Mol. Microbiol.* 90.1, p. 88–102. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/mmi.12348.
- MORLOT, Cécile et al. (2003). « Growth and division of *Streptococcus pneumoniae* : Localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle ». In : *Mol. Microbiol.* 50.3, p. 845–855. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1046/j.1365-2958.2003.03767.x.
- MORLOT, Cécile et al. (2004). « The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. » In : *Mol. Microbiol.* 51.6, p. 1641–8. ISSN : 0950-382X.
- MORTIER-BARRIÈRE, Isabelle et al. (2007). « A Key Presynaptic Role in Transformation for a Widespread Bacterial Protein : DprA Conveys Incoming ssDNA to RecA ». In : *Cell* 130.5, p. 824–836. ISSN : 00928674. DOI : 10.1016/j.cell.2007.07.038.
- MOSCOSO, M., E. GARCIA et R. LOPEZ (2006). « Biofilm Formation by *Streptococcus pneumoniae* : Role of Choline, Extracellular DNA, and Capsular Polysaccharide in Microbial Accretion ». In : *J. Bacteriol.* 188.22, p. 7785–7795. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/JB.00673-06.
- MOSSER, J L et A TOMASZ (1970). « Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. » In : *J. Biol. Chem.* 245.2, p. 287–298. ISSN : 00219258.
- MOUZ, N et al. (1999). « Mutations in the active site of penicillin-binding protein PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*. Role in the specificity for beta-lactam antibiotics. » In : *J. Biol. Chem.* 274.27, p. 19175–80. ISSN : 0021-9258.
- MOYNIHAN, Patrick J. et Anthony J. CLARKE (2010). « O-acetylation of peptidoglycan in gram-negative bacteria : Identification and characterization of peptido-

- glycan O-acetyltransferase in *Neisseria gonorrhoeae* ». In : *J. Biol. Chem.* 285.17, p. 13264–13273. ISSN : 00219258. DOI : 10.1074/jbc.M110.107086.
- (2011). « O-Acetylated peptidoglycan : Controlling the activity of bacterial autolysins and lytic enzymes of innate immune systems ». In : *Int. J. Biochem. Cell Biol.* ISSN : 13572725. DOI : 10.1016/j.biocel.2011.08.007.
- MOYNIHAN, Patrick J., David SYCHANATHA et Anthony J. CLARKE (2014). « Chemical biology of peptidoglycan acetylation and deacetylation ». In : *Bioorg. Chem.* 54, p. 44–50. ISSN : 00452068. DOI : 10.1016/j.bioorg.2014.03.010.
- MUKERJI, Reshmi et al. (2012). « Pneumococcal surface protein A inhibits complement deposition on the pneumococcal surface by competing with the binding of C-reactive protein to cell-surface phosphocholine. » In : *J. Immunol.* 189.11, p. 5327–35. ISSN : 1550-6606. DOI : 10.4049/jimmunol.1201967.
- MÜLLER, Anna, Anna KLÖCKNER et Tanja SCHNEIDER (2017). « Targeting a cell wall biosynthesis hot spot. » In : *Nat. Prod. Rep.* 34.7, p. 909–932. ISSN : 1460-4752. DOI : 10.1039/c7np00012j.
- MURA, Andrea et al. (2016). « Roles of the essential protein FtsA in cell growth and division in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *J. Bacteriol.* 199.3, e00608–16. ISSN : 1098-5530. DOI : 10.1128/JB.00608-16.
- NELSON, James W et al. (2010). « A biosynthetic strategy for re-engineering the *Staphylococcus aureus* cell wall with non-native small molecules. » In : *ACS Chem. Biol.* 5.12, p. 1147–55. ISSN : 1554-8937. DOI : 10.1021/cb100195d.
- NEUHAUS, Francis C et James BADDILEY (2003). « A continuum of anionic charge : structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. » In : *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67.4, p. 686–723. ISSN : 1092-2172. DOI : 10.1128/mnbr.67.4.686-723.2003.
- NIENHAUS, GU (2008). « The Green Fluorescent Protein : A Key Tool to Study Chemical Processes in Living Cells ». In : *Angew. Chemie Int. Ed.* 47.47, p. 8992–8994. ISSN : 14337851. DOI : 10.1002/anie.200804998.
- NOIRCLERC-SAVOYE, Marjolaine et al. (2005). « In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae* ». In : *Mol. Microbiol.* 55.2, p. 413–424. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2004.04408.x.
- NOVÁKOVÁ, Linda et al. (2005). « Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates ». In : *FEBS J.* 272.5, p. 1243–1254. ISSN : 1742464X. DOI : 10.1111/j.1742-4658.2005.04560.x.



- OGUNNIYI, Abiodun D et al. (2007). « Contributions of pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), and PspC to pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae* D39 in a mouse model. » In : *Infect. Immun.* 75.4, p. 1843–51. ISSN : 0019-9567. DOI : 10.1128/IAI.01384-06.
- OHNO, N, T YADOMAE et T MIYAZAKI (1982). « Enhancement of autolysis of *Streptococcus pneumoniae* by lysozyme. » In : *Microbiol. Immunol.* 26.4, p. 347–52. ISSN : 0385-5600.
- OKU, Yusuke et al. (2009). « Pleiotropic roles of polyglycerolphosphate synthase of lipoteichoic acid in growth of *Staphylococcus aureus* cells. » In : *J. Bacteriol.* 191.1, p. 141–51. ISSN : 1098-5530. DOI : 10.1128/JB.01221-08.
- OLRICH, Nick K. et al. (2011). « A Novel in vivo Cell-Wall Labeling Approach Sheds New Light on Peptidoglycan Synthesis in *Escherichia coli* ». In : *ChemBioChem* 12.7, p. 1124–1133. ISSN : 14394227. DOI : 10.1002/cbic.201000552.
- OMASITS, Ulrich et al. (2014). « Protter : Interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data ». In : *Bioinformatics* 30.6, p. 884–886. ISSN : 13674803. DOI : 10.1093/bioinformatics/btt607.
- ORIHUELA, Carlos J et al. (2004). « Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. » In : *J. Infect. Dis.* 190.9, p. 1661–9. ISSN : 0022-1899. DOI : 10.1086/424596.
- PAGLIERO, Estelle et al. (2004). « Biochemical characterization of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2b and its implication in beta-lactam resistance. » In : *Antimicrob. Agents Chemother.* 48.5, p. 1848–55. ISSN : 0066-4804.
- PAGLIERO, Estelle et al. (2008). « The Inactivation of a New Peptidoglycan Hydrolyase Pmp23 Leads to Abnormal Septum Formation in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *Open Microbiol. J.* 2.1, p. 107–14. DOI : 10.2174/1874285800802010107.
- PAIK, Johanna et al. (1999). « Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins ». In : *J. Bacteriol.* 181.12, p. 3852–3856. ISSN : 00219193.
- PAINTDAKHI, Ahmad et al. (2016). « Oufti : An integrated software package for high-accuracy, high-throughput quantitative microscopy analysis ». In : *Mol. Microbiol.* 99.4, p. 767–777. ISSN : 13652958. DOI : 10.1111/mmi.13264. arXiv : arXiv:1011.1669v3.
- PARES, S et al. (1996). « X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. » In : *Nat. Struct. Biol.* 3.3, p. 284–9. ISSN : 1072-8368.

- PASQUINA, Lincoln et al. (2016). « A synthetic lethal approach for compound and target identification in *Staphylococcus aureus*. » In : *Nat. Chem. Biol.* 12.1, p. 40–5. ISSN : 1552-4469. DOI : 10.1038/nchembio.1967.
- PATTERSON, David M., Lidia A. NAZAROVA et Jennifer A. PRESCHER (2014). « Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry ». In : *ACS Chem. Biol.* 9.3, p. 592–605. ISSN : 1554-8929. DOI : 10.1021/cb400828a.
- PÉDELACQ, Jean-Denis et al. (2006). « Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. » In : *Nat. Biotechnol.* 24.1, p. 79–88. ISSN : 1087-0156. DOI : 10.1038/nbt1172.
- PEPPOLONI, Samuele et al. (2013). « The Spr1875 protein confers resistance to the microglia-mediated killing of *Streptococcus pneumoniae*. » In : *Microb. Pathog.* 59-60, p. 42–47. ISSN : 08824010. DOI : 10.1016/j.micpath.2013.04.002.
- PERCY, Matthew G et Angelika GRÜNDLING (2014). « Lipoteichoic Acid Synthesis and Function in Gram-Positive Bacteria. » In : *Annu. Rev. Microbiol.* 68, p. 81–100. ISSN : 1545-3251. DOI : 10.1146/annurev-micro-091213-112949.
- PÉREZ-DORADO, I., S. GALAN-BARTUAL et J.A. HERMOSO (2012). « Pneumococcal surface proteins : when the whole is greater than the sum of its parts ». In : *Mol. Oral Microbiol.* 27.4, p. 221–245. ISSN : 20411006. DOI : 10.1111/j.2041-1014.2012.00655.x.
- PÉREZ-DORADO, Inmaculada et al. (2010). « Crystallization of the pneumococcal autolysin LytC : in-house phasing using novel lanthanide complexes. » In : *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 66.Pt 4, p. 448–51. ISSN : 1744-3091. DOI : 10.1107/S1744309110006081.
- PETERS, Katharina et al. (2014). « *Streptococcus pneumoniae* PBP2x mid-cell localization requires the C-terminal PASTA domains and is essential for cell shape maintenance ». In : *Mol. Microbiol.* 92.4, p. 733–755. DOI : 10.1111/mmi.12588.
- PFEFFER, John M. et al. (2006). « Peptidoglycan O acetylation and autolysin profile of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state ». In : *J. Bacteriol.* 188.3, p. 902–908. ISSN : 00219193. DOI : 10.1128/JB.188.3.902-908.2006.
- PHILIPPE, Jules (2014). « *Pneumococcus* morphogenesis and resistance to beta-lactams ». Thèse de doct.
- PHILIPPE, Jules et al. (2015). « Mechanism of b-lactam action in *Streptococcus pneumoniae* : the piperacillin paradox ». In : *Antimicrob. Agents Chemother.* 59.1, p. 609–621. ISSN : 10986596. DOI : 10.1128/AAC.04283-14.
- PIDGEON, Sean E et al. (2015). « Metabolic Profiling of Bacteria by Unnatural C-terminated D-Amino Acids. » In : *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 54.21, p. 6158–62. ISSN : 1521-3773. DOI : 10.1002/anie.201409927.

- PINHO, Mariana G., Morten KJOS et Jan-Willem VEENING (2013). « How to get (a)round : mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria ». In : *Nat. Rev. Microbiol.* 11.9, p. 601–614. ISSN : 1740-1526. DOI : 10.1038/nrmicro3088.
- POPHAM, D L et P SETLOW (1996). « Phenotypes of *Bacillus subtilis* mutants lacking multiple class A high-molecular-weight penicillin-binding proteins. » In : *J. Bacteriol.* 178.7, p. 2079–85. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/JB.178.7.2079-2085.1996.
- RAAPHORST, Renske van, Morten KJOS et Jan-Willem VEENING (2017). « Chromosome segregation drives division site selection in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* P. 201620608. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1620608114.
- RAJAGOPAL, Mithila et Suzanne WALKER (2015). « Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria ». In : Springer International Publishing, p. 1–44. DOI : 10.1007/82\_2015\_5021.
- RAMIL, Carlo P et Qing LIN (2013). « Bioorthogonal chemistry : strategies and recent developments. » In : *Chem. Commun. (Camb)*. 49.94, p. 11007–22. ISSN : 1364-548X. DOI : 10.1039/c3cc44272a.
- RAMOS-SEVILLANO, Elisa et al. (2011). « Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae* ». In : *PLoS One* 6.8. ISSN : 19326203. DOI : 10.1371/journal.pone.0023626.
- RAMOS-SEVILLANO, Elisa et al. (2015). « Pleiotropic effects of cell wall amidase LytA on *Streptococcus pneumoniae* sensitivity to the host immune response ». In : *Infect. Immun.* 83.2, p. 591–603. ISSN : 10985522. DOI : 10.1128/IAI.02811-14.
- RANE, L et Y SUBBAROW (1940). « Nutritional Requirements of the Pneumococcus : I. Growth Factors for Types I, II, V, VII, VIII. » In : *J. Bacteriol.* 40.5, p. 695–704. ISSN : 0021-9193.
- REGEV-YOCHAY, Gili et al. (2007). « SpxB is a suicide gene of *Streptococcus pneumoniae* and confers a selective advantage in an in vivo competitive colonization model ». In : *J. Bacteriol.* 189.18, p. 6532–6539. ISSN : 00219193. DOI : 10.1128/JB.00813-07.
- REIKO SADAMOTO, † et al. (2002). « Cell-Wall Engineering of Living Bacteria ». In : DOI : 10.1021/JA026133X.

- RICHTER, Stefan G et al. (2013). « Small molecule inhibitor of lipoteichoic acid synthesis is an antibiotic for Gram-positive bacteria. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110.9, p. 3531–6. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1217337110.
- RICO-LASTRES, Palma et al. (2015). « Substrate recognition and catalysis by LytB, a pneumococcal peptidoglycan hydrolase involved in virulence ». In : *Sci. Rep.* 5, p. 16198. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/srep16198.
- RIOS, Alessandra C. et al. (2016). « Alternatives to overcoming bacterial resistances : State-of-the-art ». In : *Microbiol. Res.* 191, p. 51–80. ISSN : 09445013. DOI : 10.1016/j.micres.2016.04.008.
- RODRIGUEZ, Jesse L, Ankur B DALIA et Jeffrey N WEISER (2012). « Increased chain length promotes pneumococcal adherence and colonization. » In : *Infect. Immun.* 80.10, p. 3454–9. ISSN : 1098-5522. DOI : 10.1128/IAI.00587-12.
- ROMERO, Patricia, Rubens LÓPEZ et Ernesto GARCÍA (2007). « Key role of amino acid residues in the dimerization and catalytic activation of the autolysin LytA, an important virulence factor in *Streptococcus pneumoniae* ». In : *J. Biol. Chem.* 282.24, p. 17729–17737. ISSN : 00219258. DOI : 10.1074/jbc.M611795200.
- ROSENOW, C et al. (1997). « Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. » In : *Mol. Microbiol.* 25.5, p. 819–829. ISSN : 0950-382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.1997.mmi494.x.
- ROSENTHAL, R S, J K BLUNDELL et H R PERKINS (1982). « Strain-related differences in lysozyme sensitivity and extent of O-acetylation of gonococcal peptidoglycan. » In : *Infect. Immun.* 37.2, p. 826–9. ISSN : 0019-9567.
- RUED, Britta E. et al. (2017). « Suppression and synthetic-lethal genetic relationships of  $\Delta$  *gpsB* mutations indicate that GpsB mediates protein phosphorylation and penicillin-binding protein interactions in *S. pneumoniae* D39 ». In : *Mol. Microbiol.* 103.6, p. 931–957. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/mmi.13613.
- SADAMOTO, Reiko et al. (2004). « Control of Bacteria Adhesion by Cell-Wall Engineering ». In : *J. Am. Chem. Soc.* 126.12, p. 3755–3761. ISSN : 0002-7863. DOI : 10.1021/ja039391i.
- SADAMOTO, Reiko et al. (2008). « Bacterial Surface Engineering Utilizing Glucosamine Phosphate Derivatives as Cell Wall Precursor Surrogates ». In : *Chem. - A Eur. J.* 14.33, p. 10192–10195. ISSN : 09476539. DOI : 10.1002/chem.200801734.
- SALERNO, Brenda, Geetha ANNE et Floyd R. BRYANT (2011). « DNA Binding Compatibility of the *Streptococcus pneumoniae* SsbA and SsbB Proteins ». In :

- PLoS One* 6.9. Sous la dir. de Vladimir N. UVERSKY, e24305. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0024305.
- SANCHEZ-PUELLES, José M. et al. (1986). « Searching for autolysin functions : Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene ». In : *Eur. J. Biochem.* 158.2, p. 289–293. ISSN : 14321033. DOI : 10.1111/j.1432-1033.1986.tb09749.x.
- SANDALOVA, Tatyana et al. (2016). « The crystal structure of the major pneumococcal autolysin LytA in complex with a large peptidoglycan fragment reveals the pivotal role of glycans for lytic activity ». In : *Mol. Microbiol.* 101.6, p. 954–967. ISSN : 13652958. DOI : 10.1111/mmi.13435.
- SANZ, Jesus Miguel, Rubens LOPEZ et Jose Luis GARCIA (1988). « Structural requirements of choline derivatives for 'conversion' of pneumococcal amidase A new single-step procedure for purification of this autolysin ». In : *FEBS Lett.* 232.2, p. 308–312. ISSN : 00145793. DOI : 10.1016/0014-5793(88)80759-2.
- SARKAR, Paramita et al. (2017). « A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics ». In : *Med. Chem. Commun.* 8.3, p. 516–533. ISSN : 2040-2503. DOI : 10.1039/C6MD00585C.
- SASKOVÁ, Lenka et al. (2007). « Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *J. Bacteriol.* 189.11, p. 4168–79. ISSN : 0021-9193. DOI : 10.1128/JB.01616-06.
- SAUVAGE, Eric et Mohammed TERRAK (2016). « Glycosyltransferases and Transpeptidases/Penicillin Binding Proteins : Valuable Targets for New Antibacterials. » In : *Antibiot. (Basel, Switzerland)* 5.1. ISSN : 2079-6382. DOI : 10.3390/antibiotics5010012.
- SAUVAGE, Eric et al. (2008). « The penicillin-binding proteins : structure and role in peptidoglycan biosynthesis ». In : *FEMS Microbiol. Rev.* 32.2, p. 234–258. ISSN : 1574-6976. DOI : 10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x.
- SCHAEFER, Kaitlin et al. (2017). « In vitro reconstitution demonstrates the cell wall ligase activity of LCP proteins ». In : *Nat. Chem. Biol.* 13.4, p. 396–401. ISSN : 1552-4450. DOI : 10.1038/nchembio.2302.
- SCHIRNER, Kathrin et al. (2009). « Distinct and essential morphogenic functions for wall- and lipo-teichoic acids in *Bacillus subtilis*. » In : *EMBO J.* 28.7, p. 830–42. ISSN : 1460-2075. DOI : 10.1038/emboj.2009.25.
- SCHLAG, Martin et al. (2010). « Role of staphylococcal wall teichoic acid in targeting the major autolysin Atl ». In : *Mol. Microbiol.* 75.4, p. 864–873. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2009.07007.x.

- SCHLEIFER, K H et O KANDLER (1972). « Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. » In : *Bacteriol. Rev.* 36.4, p. 407–77. ISSN : 0005-3678.
- SCHNEEWIND, Olaf et Dominique M MISSIAKAS (2012). « Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. » In : *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367.1592, p. 1123–39. ISSN : 1471-2970. DOI : 10.1098/rstb.2011.0210.
- SCHOLZ, Oliver et al. (2000). « Quantitative analysis of gene expression with an improved green fluorescent protein ». In : *Eur. J. Biochem.* 267.6, p. 1565–1570. ISSN : 00142956. DOI : 10.1046/j.1432-1327.2000.01170.x.
- SCHROEDER, Max R. et David S. STEPHENS (2016). « Macrolide Resistance in *Streptococcus pneumoniae* ». In : *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, p. 98. ISSN : 2235-2988. DOI : 10.3389/fcimb.2016.00098.
- SCHUSTER, C., B. DOBRINSKI et R. HAKENBECK (1990). « Unusual septum formation in *Streptococcus pneumoniae* mutants with an alteration in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3 ». In : *J. Bacteriol.* 172.11, p. 6499–6505. ISSN : 00219193.
- SEVERIN, A et A TOMASZ (1996). « Naturally occurring peptidoglycan variants of *Streptococcus pneumoniae*. » In : *J. Bacteriol.* 178.1, p. 168–74. ISSN : 0021-9193.
- SEVERIN, A et al. (1992). « Altered murein composition in a DD-carboxypeptidase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. » In : *J. Bacteriol.* 174.15, p. 5152–5. ISSN : 0021-9193.
- SHAM, L.-T. et al. (2011). « Essential PcsB putative peptidoglycan hydrolase interacts with the essential FtsXSpn cell division protein in *Streptococcus pneumoniae* D39 ». In : *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108.45, E1061–E1069. ISSN : 0027-8424. DOI : 10.1073/pnas.1108323108.
- SHAM, Lok-To 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. » In : *MBio* 4.4. ISSN : 2150-7511. DOI : 10.1128/mBio.00431-13.
- SHIMADA, Takahiro et al. (2010). « *Staphylococcus aureus* evades lysozyme-based peptidoglycan digestion that links phagocytosis, inflammasome activation, and IL-1beta secretion. » In : *Cell Host Microbe* 7.1, p. 38–49. ISSN : 1934-6069. DOI : 10.1016/j.chom.2009.12.008.
- SHIOMI, Daisuke et al. (2013). « Mutations in cell elongation genes mreB, mrdA and mrdB suppress the shape defect of RodZ-deficient cells. » In : *Mol. Microbiol.* 87.5, p. 1029–44. ISSN : 1365-2958. DOI : 10.1111/mmi.12148.

- SIDOW, Thomas, Lars JOHANNSEN et Harald LABISCHINSKI (1990). « Penicillin-induced changes in the cell wall composition of *Staphylococcus aureus* before the onset of bacteriolysis ». In : *Arch. Microbiol.* 154.1, p. 73–81. ISSN : 0302-8933. DOI : 10.1007/BF00249181.
- SIEGEL, Sara D, Jun LIU et Hung TON-THAT (2016). « Biogenesis of the Gram-positive bacterial cell envelope ». In : *Curr. Opin. Microbiol.* 34, p. 31–37. ISSN : 13695274. DOI : 10.1016/j.mib.2016.07.015.
- SIEGEL, Steven J. et Jeffrey N. WEISER (2015). « Mechanisms of Bacterial Colonization of the Respiratory Tract ». In : *Annu. Rev. Microbiol.* 69.1, p. 425–444. ISSN : 0066-4227. DOI : 10.1146/annurev-micro-091014-104209.
- SIEGRIST, M. S. et al. (2015). « Illumination of growth, division and secretion by metabolic labeling of the bacterial cell surface ». In : *FEMS Microbiol. Rev.* 39.2, p. 184–202. ISSN : 1574-6976. DOI : 10.1093/femsre/fuu012.
- SIEGRIST, M Sloan et al. (2013). « (D)-Amino acid chemical reporters reveal peptidoglycan dynamics of an intracellular pathogen. » In : *ACS Chem. Biol.* 8.3, p. 500–5. ISSN : 1554-8937. DOI : 10.1021/cb3004995.
- SIVAKUMAR, Krishnamoorthy et al. (2004). « A fluorogenic 1,3-dipolar cycloaddition reaction of 3-azidocoumarins and acetylenes. » In : *Org. Lett.* 6.24, p. 4603–6. ISSN : 1523-7060. DOI : 10.1021/ol1047955x.
- SKOVBJERG, Susann et al. (2017). « Intact Pneumococci Trigger Transcription of Interferon-Related Genes in Human Monocytes, while Fragmented, Autolyzed Bacteria Subvert This Response ». In : *Infect. Immun.* 85.5. Sous la dir. de Nancy E. FREITAG, e00960–16. ISSN : 0019-9567. DOI : 10.1128/IAI.00960-16.
- SLETTEN, Ellen M et Carolyn R BERTOZZI (2009). « Bioorthogonal chemistry : fishing for selectivity in a sea of functionality. » In : *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48.38, p. 6974–98. ISSN : 1521-3773. DOI : 10.1002/anie.200900942.
- SLIUSARENKO, Oleksii et al. (2011). « High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics ». In : *Mol. Microbiol.* 80.3, p. 612–627. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2011.07579.x. arXiv : arXiv:1011.1669v3.
- SMITH, Anthony M et Keith P KLUGMAN (2005). « Amino acid mutations essential to production of an altered PBP 2X conferring high-level beta-lactam resistance in a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. » In : *Antimicrob. Agents Chemother.* 49.11, p. 4622–7. ISSN : 0066-4804. DOI : 10.1128/AAC.49.11.4622-4627.2005.

- SMITH, Thomas J, Steve A BLACKMAN et Simon J FOSTER (2000). « Autolysins of *Bacillus subtilis* : Multiple enzymes with multiple functions ». In : *Microbiology* 146.2, p. 249–262. ISSN : 13500872. DOI : 10.1115/1.4026364.
- SOHLENKAMP, Christian, Isabel M LÓPEZ-LARA et Otto GEIGER (2003). « Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. » In : *Prog. Lipid Res.* 42.2, p. 115–62. ISSN : 0163-7827.
- SONG, Joon Young, Byung Wook EUN et Moon H. NAHM (2013). « Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia : Current Pitfalls and the Way Forward ». In : *Infect. Chemother.* 45.4, p. 351. ISSN : 2093-2340. DOI : 10.3947/ic.2013.45.4.351.
- SPICER, Christopher D. et Benjamin G. DAVIS (2014). « Selective chemical protein modification ». In : *Nat. Commun.* 5, p. 4740. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/ncomms5740.
- STANDISH, Alistair J., Jonathan J. WHITTALL et Renato MORONA (2014). « Tyrosine phosphorylation enhances activity of pneumococcal autolysin LytA ». In : *Microbiology* 160, p. 2745–2754. ISSN : 14652080. DOI : 10.1099/mic.0.080747-0.
- STEINMOEN, Hilde, Eivind KNUTSEN et Leiv Sigve HÅVARSTEIN (2002). « Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99.11, p. 7681–6. ISSN : 0027-8424. DOI : 10.1073/pnas.112464599.
- STIMPSON, S A et al. (1986). « Arthropathic properties of cell wall polymers from normal flora bacteria. » In : *Infect. Immun.* 51.1, p. 240–9. ISSN : 0019-9567.
- STRATING, Henri et Anthony J. CLARKE (2001). « Differentiation of Bacterial Autolysins by Zymogram Analysis ». In : *Anal. Biochem.* 291.1, p. 149–154. ISSN : 00032697. DOI : 10.1006/abio.2001.5007.
- STRAUME, Daniel et al. (2017). « Overexpression of the fratricide immunity protein ComM leads to growth inhibition and morphological abnormalities in *Streptococcus pneumoniae* ». In : *Microbiology* 163.1, p. 9–21. ISSN : 1350-0872. DOI : 10.1099/mic.0.000402.
- SUN, Xuesong et al. (2010). « Phosphoproteomic Analysis Reveals the Multiple Roles of Phosphorylation in Pathogenic Bacterium *Streptococcus pneumoniae* ». In : *J. Proteome Res.* 9.1, p. 275–282. DOI : 10.1021/pr900612v.
- SUNG, C. K. et al. (2001). « An *rpsL* Cassette, Janus, for Gene Replacement through Negative Selection in *Streptococcus pneumoniae* ». In : *Appl. Environ. Microbiol.* 67.3-12, p. 5190–5196. ISSN : 00992240. DOI : 10.1128/AEM.67.11.5190-5196.2001.



- SWIM, S C et al. (1983). « Strain distribution in extents of lysozyme resistance and O-acetylation of gonococcal peptidoglycan determined by high-performance liquid chromatography. » In : *Infect. Immun.* 42.2, p. 446–52. ISSN : 0019-9567.
- TACCONELLI, E et al. (2017). « Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics ». In : *WHO*.
- TETTELIN, Hervé et al. (2001). « Complete Genome Sequence of a Virulent Isolate of *Streptococcus pneumoniae* ». In : *Science (80-. )*. 293.5529.
- THIRUMURUGAN, Prakasam, Dariusz MATOSIUK et Krzysztof JOZWIAK (2013). « Click Chemistry for Drug Development and Diverse Chemical Biology Applications ». In : *Chem. Rev.* 113.7, p. 4905–4979. DOI : 10.1021/cr200409f.
- TILLET, W S, W F GOEBEL et O T AVERY (1930). « CHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF A SPECIES-SPECIFIC CARBOHYDRATE OF PNEUMOCOCCI. » In : *J. Exp. Med.* 52.6, p. 895–900. ISSN : 0022-1007.
- TOMASZ, A (1967). « Choline in the cell wall of a bacterium : novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. » In : *Science* 157.3789, p. 694–7. ISSN : 0036-8075.
- TOMASZ, A et J L MOSSER (1966). « On the nature of the pneumococcal activator substance. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 55.1, p. 58–66. ISSN : 0027-8424. DOI : 10.1073/pnas.55.1.58.
- TOMASZ, A et S WAKS (1975). « Mechanism of action of penicillin : triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72.10, p. 4162–4166. ISSN : 0306-624X. DOI : 10.1177/0306624X9503900408.
- TOMASZ, Alexander (1968). « Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of *Pneumococcus* : choline formation, loss of transformability, and loss of autolysis. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 59.1, p. 86–93. ISSN : 0027-8424.
- TOMASZ, ALEXANDER, ANTHONY ALBINO et EVE ZANATI (1970). « Multiple Antibiotic Resistance in a Bacterium with Suppressed Autolytic System ». In : *Nature* 227.5254, p. 138–140. ISSN : 0028-0836. DOI : 10.1038/227138a0.
- TRA, Van N et Danielle H DUBE (2014). « Glycans in pathogenic bacteria—potential for targeted covalent therapeutics and imaging agents. » In : *Chem. Commun. (Camb)*. 50.36, p. 4659–73. ISSN : 1364-548X. DOI : 10.1039/c4cc00660g.
- TSUI, Ho Ching T et al. (2014). « Pbp2x localizes separately from Pbp2b and other peptidoglycan synthesis proteins during later stages of cell division of *Streptococcus pneumoniae* D39 ». In : *Mol. Microbiol.* 94.1, p. 21–40. ISSN : 13652958. DOI : 10.1111/mmi.12745.

- TSUI, Ho-Ching Tiffany et al. (2016). « Suppression of a deletion mutation in the gene encoding essential PBP2b reveals a new lytic transglycosylase involved in peripheral peptidoglycan synthesis in *Streptococcus pneumoniae* D39 ». In : *Mol. Microbiol.* 100.6, p. 1039–1065. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/mmi.13366.
- TURNER, Robert D., Waldemar VOLLMER et Simon J. FOSTER (2014). « Different walls for rods and balls : the diversity of peptidoglycan ». In : *Mol. Microbiol.* 91.5, p. 862–874. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/mmi.12513.
- TYPAS, Athanasios et al. (2011). « From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology ». In : *Nat. Rev. Microbiol.* 10.2, p. 123–36. ISSN : 1740-1526. DOI : 10.1038/nrmicro2677.
- VASSAL-STERMANN, Emilie et al. (2014). « Human L-Ficolin Recognizes Phosphocholine Moieties of Pneumococcal Teichoic Acid ». In : *J. Immunol.* 193.11, p. 5699–5708. ISSN : 0022-1767. DOI : 10.4049/jimmunol.1400127.
- VEIGA, P. et al. (2007a). « SpxB Regulates O-Acetylation-dependent Resistance of *Lactococcus lactis* Peptidoglycan to Hydrolysis ». In : *J. Biol. Chem.* 282.27, p. 19342–19354. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.M611308200.
- VEIGA, Patrick et al. (2007b). « SpxB Regulates O-Acetylation-dependent Resistance of *Lactococcus lactis* Peptidoglycan to Hydrolysis ». In : *J. Biol. Chem.* 282.27, p. 19342–19354. DOI : 10.1074/jbc.M611308200.
- VEYRIER, Frédéric J. et al. (2013). « De-O-acetylation of peptidoglycan regulates glycan chain extension and affects in vivo survival of *Neisseria meningitidis* ». In : *Mol. Microbiol.* 87.5, p. 1100–1112. DOI : 10.1111/mmi.12153.
- VOCADLO, D J et al. (2001). « Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. » In : *Nature* 412.6849, p. 835–8. ISSN : 0028-0836. DOI : 10.1038/35090602.
- VOLANAKIS, J E et M H KAPLAN (1971). « Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. » In : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 136.2, p. 612–4. ISSN : 0037-9727.
- VOLLMER, W et A TOMASZ (2000). « The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *J. Biol. Chem.* 275.27, p. 20496–501. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.M910189199.
- VOLLMER, W. et A. TOMASZ (2001). « Identification of the teichoic acid phosphorylcholine esterase in *Streptococcus pneumoniae* ». In : *Mol. Microbiol.* 39.6, p. 1610–1622. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1046/j.1365-2958.2001.02349.x.

- VOLLMER, Waldemar (2008). « Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan ». In : *FEMS Microbiol. Rev.* 32.2, p. 287–306. ISSN : 01686445. DOI : 10.1111/j.1574-6976.2007.00088.x.
- VOLLMER, Waldemar, Didier BLANOT et Miguel A. DE PEDRO (2008). « Peptidoglycan structure and architecture ». In : *FEMS Microbiol. Rev.* 32.2, p. 149–167. ISSN : 1574-6976. DOI : 10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x.
- VOLLMER, Waldemar et Stephen J. SELIGMAN (2010). « Architecture of peptidoglycan : more data and more models ». In : *Trends Microbiol.* 18.2, p. 59–66. ISSN : 0966842X. DOI : 10.1016/j.tim.2009.12.004.
- VOLLMER, Waldemar et Alexander TOMASZ (2002). « Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase, a putative virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. » In : *Infect. Immun.* 70.12, p. 7176–8. ISSN : 0019-9567.
- VOLLMER, Waldemar et al. (2008). « Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases ». In : *FEMS Microbiol. Rev.* 32.2, p. 259–286. ISSN : 01686445. DOI : 10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x.
- VOSS, Sylvia et al. (2013). « The choline-binding protein PspC of *Streptococcus pneumoniae* interacts with the C-terminal heparin-binding domain of vitronectin. » In : *J. Biol. Chem.* 288.22, p. 15614–27. ISSN : 1083-351X. DOI : 10.1074/jbc.M112.443507.
- WANG, Xindan, Paula MONTERO LLOPIS et David Z RUDNER (2014). « *Bacillus subtilis* chromosome organization oscillates between two distinct patterns. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111.35, p. 12877–82. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1407461111.
- WANG, Xindan et David Z RUDNER (2014). « Spatial organization of bacterial chromosomes ». In : *Curr. Opin. Microbiol.* 22, p. 66–72. ISSN : 13695274. DOI : 10.1016/j.mib.2014.09.016.
- WANNER, Stefanie et al. (2017). « Wall teichoic acids mediate increased virulence in *Staphylococcus aureus*. » In : *Nat. Microbiol.* 2, p. 16257. ISSN : 2058-5276. DOI : 10.1038/nmicrobiol.2016.257.
- WARTHA, Florian et al. (2007). « Capsule and d-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps ». In : *Cell. Microbiol.* 9.5, p. 1162–1171. ISSN : 1462-5814. DOI : 10.1111/j.1462-5822.2006.00857.x.
- WEADGE, Joel T. et Anthony J. CLARKE (2005). « Identification and Characterization of O-Acetylpeptidoglycan Esterase : A Novel Enzyme Discovered in *Neisseria gonorrhoeae*. » In : DOI : 10.1021/BI051679S.

- WEADGE, Joel T, John M PFEFFER et Anthony J CLARKE (2005). « Identification of a new family of enzymes with potential O-acetylpeptidoglycan esterase activity in both Gram-positive and Gram-negative bacteria. » In : *BMC Microbiol.* 5, p. 49. ISSN : 1471-2180. DOI : 10.1186/1471-2180-5-49.
- WEIDENMAIER, Christopher et Andreas PESCHEL (2008). « Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions ». In : *Nat. Rev. Microbiol.* 6.4, p. 276–287. ISSN : 1740-1526. DOI : 10.1038/nrmicro1861.
- WEISER, J N et al. (1994). « Phase variation in pneumococcal opacity : relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. » In : *Infect. Immun.* 62.6, p. 2582–9. ISSN : 0019-9567.
- WEISER, J N et al. (1996). « Relationship between phase variation in colony morphology, intrastrain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. » In : *Infect. Immun.* 64.6, p. 2240–5. ISSN : 0019-9567.
- WHATMORE, A M et C G DOWSON (1999). « The autolysin-encoding gene (*lytA*) of *Streptococcus pneumoniae* displays restricted allelic variation despite localized recombination events with genes of pneumococcal bacteriophage encoding cell wall lytic enzymes. » In : *Infect. Immun.* 67.9, p. 4551–6. ISSN : 0019-9567.
- WHEELER, Richard et al. (2011). « Super-resolution microscopy reveals cell wall dynamics and peptidoglycan architecture in ovococcal bacteria ». In : *Mol. Microbiol.* 82.5, p. 1096–1109. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2011.07871.x.
- WIZEMANN, T M et al. (2001). « Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. » In : *Infect. Immun.* 69.3, p. 1593–8. ISSN : 0019-9567. DOI : 10.1128/IAI.69.3.1593-1598.2001.
- WU, Kaifeng et al. (2014). « A novel protein, RafX, is important for common cell wall polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* : implications for bacterial virulence. » In : *J. Bacteriol.* 196.18, p. 3324–34. ISSN : 1098-5530. DOI : 10.1128/JB.01696-14.
- XU, Hongmei et al. (2015). « Pneumococcal wall teichoic acid is required for the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* in murine models ». In : *J. Microbiol.* 53.2, p. 147–154. ISSN : 1225-8873. DOI : 10.1007/s12275-015-4616-4.
- YAMAMOTO, Hiroki et al. (2008). « The major and minor wall teichoic acids prevent the sidewall localization of vegetative dl-endopeptidase LytF in *Bacillus sub-*

- tilis*</i>* ». In : *Mol. Microbiol.* 70.2, p. 297–310. DOI : 10.1111/j.1365-2958.2008.06397.x.
- YANG, Maiyun, Jie LI et Peng R CHEN (2014). « Transition metal-mediated biorthogonal protein chemistry in living cells. » In : *Chem. Soc. Rev.* 43.18, p. 6511–26. ISSN : 1460-4744. DOI : 10.1039/c4cs00117f.
- YEATS, Corin, Robert D. FINN et Alex BATEMAN (2002). « The PASTA domain : A  $\beta$ -lactam-binding domain ». In : *Trends Biochem. Sci.* 27.9, p. 438–440. ISSN : 09680004. DOI : 10.1016/S0968-0004(02)02164-3.
- YI, Wen et al. (2009). « Remodeling bacterial polysaccharides by metabolic pathway engineering. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106.11, p. 4207–12. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.0812432106.
- YOTHER, T (2004). « Capsules ». In : *The pneumococcus*. Sous la dir. d'E TUOMANEN et al. American Society of Microbiology, p. 30–48. DOI : 10.1128/9781555816537.ch3.
- YOUNG, N. Martin, Simon J. FOOTE et Warren W. WAKARCHUK (2013). « Review of phosphocholine substituents on bacterial pathogen glycans : Synthesis, structures and interactions with host proteins ». In : *Mol. Immunol.* 56.4, p. 563–573. ISSN : 01615890. DOI : 10.1016/j.molimm.2013.05.237.
- YOUSIF, S. Y., J. K. BROOME-SMITH et B. G. SPRATT (1985). « Lysis of *Escherichia coli* by  $\beta$ -Lactam Antibiotics : Deletion Analysis of the Role of Penicillin-binding Proteins 1A and 1B ». In : *Microbiology* 131.10, p. 2839–2845. ISSN : 1350-0872. DOI : 10.1099/00221287-131-10-2839.
- YUNCK, Rachel, Hongbaek CHO et Thomas G. BERNHARDT (2016). « Identification of MltG as a potential terminase for peptidoglycan polymerization in bacteria ». In : *Mol. Microbiol.* 99.4, p. 700–718. ISSN : 0950382X. DOI : 10.1111/mmi.13258.
- ZALACAIN, Magdalena et al. (2003). « A global approach to identify novel broad-spectrum antibacterial targets among proteins of unknown function. » In : *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 6.2, p. 109–26. ISSN : 1464-1801. DOI : 76741.
- ZAPUN, André, Carlos CONTRERAS-MARTEL et Thierry VERNET (2008). « Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance ». In : *FEMS Microbiol. Rev.* 32.2, p. 361–385. ISSN : 1574-6976. DOI : 10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x.
- ZAPUN, André, Thierry VERNET et Mariana G. PINHO (2008). « The different shapes of cocci ». In : *FEMS Microbiol. Rev.* 32.2, p. 345–360. ISSN : 1574-6976. DOI : 10.1111/j.1574-6976.2007.00098.x.
- ZHANG, Gong et al. (2015). « Illuminating biological processes through site-specific protein labeling. » In : *Chem. Soc. Rev.* 44.11, p. 3405–17. ISSN : 1460-4744. DOI : 10.1039/c4cs00393d.

## Abstract

Gram-positive bacteria cell wall (CW) is composed by peptidoglycan (PG) and teichoic acids (TA). We studied both CW components and revealed new regulation mechanisms in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. We showed that PG O-acetylation occurs in the early steps of PG biosynthesis, promotes the formation of mature PG and plays a role in cell division. We developed an innovative click chemistry-based approach to label TA in live cells, opening the way to explore mechanistic issues of pneumococcal TA biosynthesis. We showed that TA synthesis is septal and correlated with PG synthesis. Finally, we showed that both PG and TA polymers contribute to regulate the major autolysin LytA which binds TA and cleaves the PG : the O-acetylation of PG protects dividing cells from LytA-induced autolysis while TA finely regulates LytA surface localization. In conclusion, our work highlights the cooperative role of PG and TA in CW biosynthesis, cell division and regulation of surface components.

**Key-words :** *Streptococcus pneumoniae*, Cell Wall, Peptidoglycan, O-acetylation, Teichoic acids, Click chemistry

## Résumé

La paroi des bactéries à Gram positif se compose du peptidoglycane (PG) et des acides téichoïques (TA). Leur étude a révélé de nouveaux mécanismes de régulation chez le pathogène humain *Streptococcus pneumoniae*. Nous avons montré que la O-acétylation intervient précocement dans la biosynthèse du PG, participe à sa maturation et à la division cellulaire. De plus, nous avons développé une approche innovante basée sur la chimie click pour le marquage *in vivo* des TA qui a révélé que leur synthèse est septale et corrélée à celle du PG. Le PG et les TA contribuent aussi à réguler l'activité enzymatique de l'autolysine majeure du pneumocoque LytA : la O-acétylation du PG protège les cellules en division de l'autolyse par LytA et les TA, sur lesquels elle se fixe, régulent sa localisation de surface. Pour conclure, ce travail souligne le rôle coopératif du PG et des TA dans la synthèse de la paroi, la division cellulaire et la régulation de composants de la surface bactérienne.

**Mots-clefs :** *Streptococcus pneumoniae*, Paroi, Peptidoglycane, O-acétylation, Acides téichoïques, Chimie click