



HAL
open science

Etude de la morphogénèse et de la division chez *Streptococcus pneumoniae* par microscopie de localisation de molécule unique

Christopher Arthaud

► **To cite this version:**

Christopher Arthaud. Etude de la morphogénèse et de la division chez *Streptococcus pneumoniae* par microscopie de localisation de molécule unique. Bactériologie. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV024 . tel-02003659

HAL Id: tel-02003659

<https://theses.hal.science/tel-02003659>

Submitted on 1 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 LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Virologie - Microbiologie - Immunologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Christopher ARTHAUD

Thèse dirigée par **Cécile MORLOT**, cnrs

préparée au sein du **Laboratoire Institut de Biologie Structurale**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Etude de la morphogénèse et de la division chez Streptococcus pneumoniae par microscopie de localisation de molécule unique

Morphogenesis and division in Streptococcus pneumoniae

Thèse soutenue publiquement le **18 octobre 2018**,
devant le jury composé de :

Monsieur TAM MIGNOT

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION PROVENCE ET
CORSE, Rapporteur

Madame ANNE-MARIE DI GUILMI

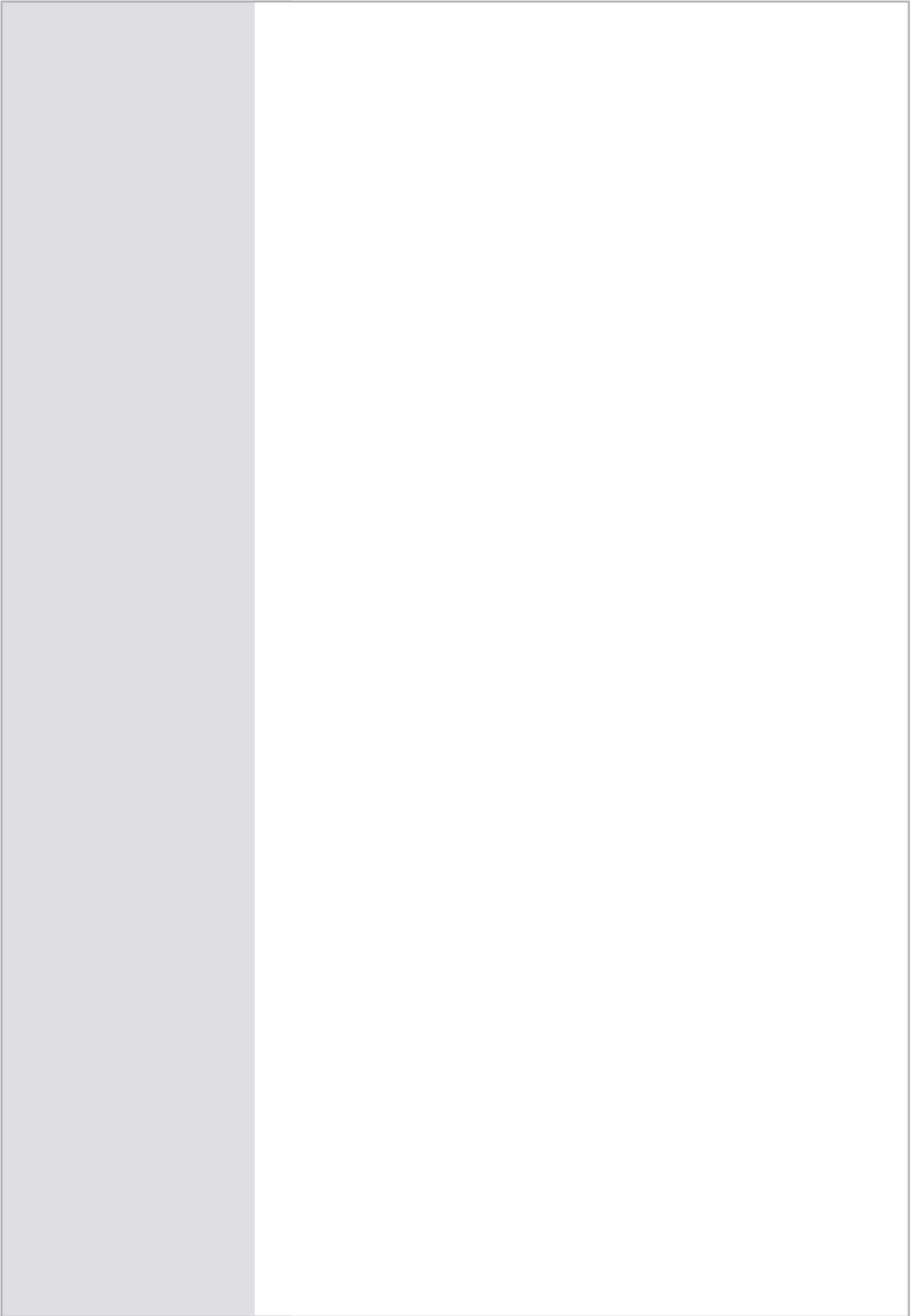
INGENIEUR DE RECHERCHE, CEA DE FONTENAY-AUX-ROSES,
Examineur

Monsieur CHRISTOPHE GRANGEASSE

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION RHONE
AUVERGNE, Président

Monsieur JEAN-EMMANUEL HUGONNET

MAITRE DE CONFERENCES, UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE,
Examineur



Remerciements

Dans un premier temps je souhaite remercier chaleureusement tous les membres de mon jury de thèse. Je remercie les Dr. Tam Mignot et Dr. Rut Carballido-Lopez d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie également les Dr. Anne-Marie Di Guilmi et Dr. Jean-Emmanuel Hugonnet d'avoir accepté de juger mon travail. Enfin, je suis très reconnaissant envers le Dr. Christophe Grangeasse, qui a non seulement accepté de faire partie de mon jury de thèse, mais qui m'a aussi soutenu et apporté ses conseils tout au long de ces trois années dans le cadre du comité de suivi de thèse avec le Dr. Pauline Macheboeuf que je remercie également.

Je souhaite remercier l'équipe Pixel, et plus particulièrement Virgile et Dominique, pour leur précieuse aide pour la microscopie super-résolue. C'est une grande chance pour les biologistes d'avoir accès à du matériel si sophistiqué. Je vous souhaite de mener à bien tous vos projets.

Je remercie également tous les membres actuels ou passés du groupe PG pour leur bonne humeur, leurs conseils, et les petits goûters dans le « grand bureau ». Les permanents de l'équipe qui sont la colonne vertébrale de cette équipe, Cécile, Anne-Marie Villard, Anne-marie Di Guilmi, Claire, André, Thierry, et Laure. J'ai une pensée également pour les doctorants et post-docs que j'ai eu la chance de croiser, Maxime, Julie, Philippe, Bowen, et Jennyfer. Je tiens également à adresser des remerciements à tous les stagiaires avec qui j'ai eu la chance de travailler, et qui m'ont montré à quel point j'aime transmettre ma passion des sciences, Laura, Elda, Alicia, et Salomé.

Je tiens particulièrement à remercier Thierry de m'avoir donné ma chance en m'acceptant dans son laboratoire, et pour les discussions très intéressantes que l'on a pu avoir. Merci également à André pour son expertise sur la division du pneumocoque et pour les discussions que l'on a eu, qui m'ont bien souvent permis de mûrir mes idées. Merci enfin à Laure, peut-être la meilleure des techniciennes,

certainement la meilleure des collègues, merci pour nos fous rires qui vont tant me manquer, je te souhaite tout le bonheur du monde avec ta petite famille.

Un remerciement très spécial revient à Cécile. Que de temps a passé depuis mon arrivé en L3. J'ai conscience du temps et de l'investissement que nécessite l'encadrement d'un doctorant. Tu m'as aidé, poussé, toujours avec bienveillance. Merci également pour la correction de ce manuscrit, tu as tenu à merveille ton rôle de remodelasome. Cette rédaction fut une grande aventure et j'ai de la chance d'avoir pu compter sur toi.

La vie ne s'arrête pas aux portes du labo, j'ai la chance d'avoir une famille remplie de belles personnes sans qui rien de tout ça n'aurait de sens. Je ne peux pas citer tout le monde ici, mais je pense particulièrement à ma « presque » belle famille, Sylvianne et Gilles qui m'ont accueilli à bras ouvert, tout comme Daniel et Joëlle pour votre gentillesse à toute épreuve, vous faites partie de la famille. Je pense aussi Enrick et mes deux merveilleuses nièces, vous m'avez souvent permis de me changer les idées durant les moments difficiles. Je pense aussi à papy, tu m'as tant donné depuis que je suis né, je sais que je ne pourrais jamais assez te remercier. Enfin, je vous remercie, papa, maman, pour m'avoir tant donné depuis 27 ans, pour les sacrifices que vous avez fait pour nous élever et pour nous donner une situation. Je vous aime fort.

Gabrielle, j'ai réservé le mot de la fin pour toi mon cœur. Tu m'as énormément aidé durant la rédaction de ce manuscrit, je n'aurais certainement pas tenu le coup sans toi. Pendant ces trois années de thèse tu as tout vécu avec moi, les joies, les peines, les désespoirs parfois. Tu m'as toujours soutenu, même sans un mot, juste ta présence, ton sourire. J'aime nos fous rires, nos disputes, nos discussions enflammées, nos séries du matin, nos séries du soir, ces milliers de petites choses du quotidien qui font que tu es plus que l'amour de ma vie, tu fais partie de moi. Merci d'être là.

... Ah, j'ai failli oublier ... CHAMPIONS DU MONDE !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!



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.

Sauf mention contraire, l'ensemble des figures de ce manuscrit ont été créées par moi-même.

Dans la publication 1 présentée en annexe, j'ai créé certaines souches et j'ai effectué leur observation en microscopie à fluorescence. J'ai également réalisé toutes les expériences de marquage de la synthèse du peptidoglycane. Dans la publication 2 présentée en annexe, j'ai créé la souche exprimant la protéine de fusion FtsZ-mKate2.

Dans la partie *Résultats* du manuscrit de thèse, l'ensemble des expériences de microscopie optique, le traitement des images et leur analyse ont été effectués par moi-même. J'ai également créé la souche exprimant la protéine de fusion EzrA-spDendra2. La souche exprimant la protéine de fusion FtsZ-spDendra2 a été créée par Maxime Jacq au cours de sa thèse. Les souches de délétions des protéines StkP, GpsB et DivIVA ont été créées par l'équipe de Christophe Grangeasse. Le montage du microscope PALM et le support technique pour l'acquisition de données ont été réalisés par les docteurs Virgile Adam et Dominique Bourgeois de l'équipe PIXEL à l'IBS. L'analyse des données PALM/dSTORM et la rédaction des scripts sous R pour les analyses statistiques ont été effectuées par moi-même. Les molécules zDA, zDADA et DADAz permettant le marquage du peptidoglycane ont été synthétisées par le docteur Yung-Sing Wong du Département de Pharmacologie Moléculaire à l'Université Grenoble Alpes.

Résumé

La morphogénèse des ovocoques, dont fait partie le pathogène humain *Streptococcus pneumoniae*, implique des processus d'élongation et de division associés à la synthèse de la paroi bactérienne. Le composant majeur de cette paroi est le peptidoglycane, un polymère de sucre réticulé par des chaînes peptidiques, qui confère la forme de la bactérie et est essentiel à sa survie. La synthèse de peptidoglycane nécessaire à l'élongation et la division bactérienne est effectuée par des complexes protéiques appelés respectivement « élongasome » et « divisome ». Les mécanismes d'assemblage et l'activité de ces complexes dans la cellule bactérienne restent encore non élucidés. Pour imager l'activité des complexes de synthèse du peptidoglycane *in vivo* à l'échelle du nanomètre, j'ai développé une méthode faisant appel à des dérivés de D-amino acides, à la chimie click et à la microscopie de localisation de molécules uniques (dSTORM ou direct Stochastic reconstruction microscopy). Cette méthode a permis d'obtenir des images à une résolution d'environ 20 nm, révélant des aspects inattendus de la synthèse du peptidoglycane et remettant en question le rôle de certaines protéines dans la morphogénèse du pneumocoque. En combinant ces observations avec les données de la littérature, un modèle simplifié de la morphogénèse des ovocoques est proposé.

The morphogenesis of ovococci, which include the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*, involves elongation and division processes associated with cell wall synthesis. The main component of the cell wall is the peptidoglycan, a polymer made of glycan chains cross-linked by peptide chains, which confers the bacterial shape and is essential for cell survival. Peptidoglycan synthesis required for cell elongation and division is performed by large protein complexes called “elongasome” and “divisome”, respectively. The assembly mechanisms and activity of these complexes in the bacterial cell remain mysterious. To image the activity of the peptidoglycan synthesis complexes *in vivo* at the nanoscale, I developed a method combining D-amino acid derivatives, click chemistry and single-molecule localization microscopy (dSTORM or direct Stochastic reconstruction microscopy). This method allowed obtaining images at a resolution of about 20 nm resolution, revealing unexpected features of peptidoglycan synthesis and challenging the role of some proteins in pneumococcus morphogenesis. By combining these observations with data from the literature, a simplified model of ovococci morphogenesis is proposed.

Abréviations

AAC :	Cycloaddition azide-alkyne
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AF647 :	Alexa Fluor 647
ANSM :	Agence nationale de sécurité du médicament
ARN :	Acide ribonucléique
BME :	β -mercaptoéthanol
CBD :	Domaine de liaison à la choline (Choline-binding domain)
CSP :	Peptide de stimulation de la compétence (Competence stimulation peptide)
CWHs :	Hydrolases de la paroi (Cell wall hydrolases)
D-Ala :	D-alanine
D-Ala-D-Ala :	D-alanyl-D-alanine
zDA :	Azide-D-alanine
zDADA :	Azide-D-alanyl-D-alanine
DADAz :	D-alanyl-D-alanine-azide
DAA :	D-aminoacide
DIBO :	Dibenzocyclooctyne
cryo-EM :	Cryo-microscopie électronique (cryo-electron microscopy)
FDAAs :	Molécules fluorescentes dérivées de la D-alanine (Fluorescent D-amino acids)
FRAP :	Retour de fluorescence après photo-blanchiment (Fluorescence recovery after photobleaching)
h :	Heure
iGln :	Iso-glutamine
k :	Kilo
Glu :	Glutamate
GTP :	Guanosine diphosphate
GT :	Glycosyltransférase
GTP :	Guanosine triphosphate
LPS :	Lipopolysaccharide
μm :	Micromètre
nm :	Nanomètre
min :	Minute
M :	Molaire
MEA :	Mercaptoéthanolamine

MC :	Méthylcellulose
MOP :	Multidrug/oligo-saccharidyl-lipid/polysaccharide
NBD-lipide II :	7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl-lipide II
OD :	Densité optique (Optical density)
OMS :	Organisation mondiale de la santé
PALM :	Microscopie par localisation photo-activée (Photo-activated localization microscopy)
PBP :	Protéine liant la pénicilline (Penicillin-binding proteins)
aPBP :	PBP de classe A
bPBP :	PBP de classe B
PBS :	Tampon phosphate salin (Phosphate buffer saline)
PEP :	Phosphoenolpyruvate
PG :	Peptidoglycane
PSF :	Fonction d'étalement du point (Point spread function)
PVA :	Alcool polyvinylique (Polyvinyl alcohol)
SEDS :	Forme, elongation, division et sporulation (Shape, elongation, division and sporulation)
SIM :	Microscopie par illumination structurée (Structured illumination microscopy)
SMLM :	Microscopie de localisation de molécules uniques (Single molecule localization microscopy)
STED :	Microscopie de déplétion par émission stimulée (Stimulated emission depletion)
dSTORM :	Microscopie directe de reconstruction optique stochastique (direct Stochastic optical reconstruction microscopy)
TP :	Transpeptidase
Und-P :	Undécaprényl phosphate
UDP :	Uridine-5'-diphosphate
UDP-GlcNAc :	Uridine 5'-diphospho-N-acetyl-d-glucosamine
UDP-MurNAc :	UDP-acide-N-acétylmuramique
UV :	Ultra-violet

Précision :

Le terme de « **septum** » désigne l'apparition d'une cloison de peptidoglycane (PG) au centre de la cellule en division. Il ne doit pas être confondu avec le terme de « **PG septal** » qui est le PG synthétisé de manière centripète par le divisome. Le septum est constitué de PG septal, mais le PG septal peut ne pas former de septum si sa partition (hydrolyse ménagée) est aussi rapide que sa synthèse.

Table des matières

Remerciements.....	1
Contribution aux travaux	3
Résumé	5
Abréviations.....	7
Table des matières	10
INTRODUCTION	15
1. Le pneumocoque	15
1.1. Historique	15
1.2. Epidémiologie.....	16
1.3. Principaux champs d'études.....	16
1.3.1. La virulence	16
1.3.2. La compétence	19
1.3.3. La résistance aux antibiotiques	20
1.3.4. La division et la morphologie.....	21
2. Division bactérienne et morphogénèse	22
2.1. Généralités sur la morphologie des bactéries.....	22
2.1.1. Les différentes morphologies.....	23
2.1.2. La paroi bactérienne.....	26
2.2. Mécanismes impliqués dans la division.....	27
2.2.1. Réplication et ségrégation du matériel génétique	27
2.2.2. Détermination du site de division.....	28
2.2.3. Constriction de la membrane.....	30
2.2.4. Synthèse du peptidoglycane	32
2.2.5. Rôle du cytosquelette bactérien dans la division	32

2.3.	La division du pneumocoque	34
2.3.1.	La synthèse du lipide II	34
2.3.2.	La synthèse du peptidoglycane.....	40
2.3.3.	L'hydrolyse du peptidoglycane	47
2.3.4.	La régulation des machineries morphogénétiques	51
3.	Microscopie optique et super-résolution.....	64
3.1.	La microscopie optique	64
3.2.	La microscopie de fluorescence	65
3.3.	La limite de résolution en microscopie optique	66
3.4.	Les microscopies à super-résolution.....	67
3.4.1.	La microscopie par illumination structurée (SIM)	67
3.4.2.	Déplétion par émission stimulée (STED)	67
3.4.3.	Les microscopies de localisation de molécules uniques	68
3.5.	Exemple d'utilisation de la microscopie en biologie : le marquage de la synthèse du peptidoglycane	72
	Résultats	77
1.	Contexte et objectifs de ma thèse	77
2.	Assemblage des machineries morphogénétiques	79
2.1	Introduction.....	79
2.2	Résultats et discussion	81
3.	Synthèse du peptidoglycane.....	86
3.1	Introduction.....	86
3.2	Résultats.....	87
	Discussion	117
	Matériel et méthodes.....	129
	Annexes.....	138

Annexe 1 : The cell wall hydrolase Pmp23 is important for assembly and stability of the division ring in <i>Streptococcus pneumoniae</i>	138
Annexe 2 : Peptidoglycan O-acetylation is functionally related to cell wall biosynthesis and cell division in <i>Streptococcus pneumoniae</i>	152
Annexe 3 : Analyse du peptidoglycane de <i>S. pneumoniae</i>	167
BIBLIOGRAPHIE	168

INTRODUCTION

1. Le pneumocoque

1.1. Historique

Le premier isolement de *Streptococcus pneumoniae* a été réalisé en 1881 par Louis Pasteur à partir de la salive d'un enfant mort de la rage (Pasteur, 1881). Il a remarqué que cette salive possédait un agent infectieux très virulent qui avait « la forme d'un bâtonnet très court, rétréci en son milieu, analogue à un 8 de chiffre, d'un diamètre de 1/1000 de millimètre au moins, entouré d'une substance gélatiniforme, ayant l'aspect d'une auréole pâle ». Cet agent infectieux sera peu de temps après nommé pneumocoque du fait de sa présence dans les prélèvements effectués sur des patients atteints de pneumonie. Le pneumocoque a été renommé *Diplococcus pneumoniae* par le « comité de la société américaine de bactériologistes sur la caractérisation et la classification des types bactériens » en 1920 en se basant sur sa morphologie dans les expectorations de patients (Winslow and Broadhurst, 1920). Ce nom a été longtemps remis en cause du fait que le pneumocoque forme fréquemment des chaînes lorsqu'il est cultivé en conditions de laboratoire. Ce n'est qu'en 1974 qu'il a officiellement été nommé *Streptococcus pneumoniae*.

Le pneumocoque a joué un rôle central dans la naissance de la génétique moléculaire. En 1928, Frederick Griffith a découvert qu'une souche non-virulente de pneumocoque est devenue virulente après avoir été inoculée à une souris en même temps qu'un lysat de souche virulente (Griffith, 1928). Reproduisant ces travaux en 1944, Oswald Avery attribua ce facteur transformant à l'ADN. La découverte de la transformation génétique chez le pneumocoque a constitué la première étape vers la reconnaissance de l'ADN comme support de l'hérédité (Avery et al., 1944).

1.2. Epidémiologie

Le pneumocoque est une bactérie communément retrouvée dans les voies respiratoires de l'humain. Non pathologique chez les individus sains, le pneumocoque peut toutefois être responsable d'infections potentiellement mortelles chez des individus dont le système immunitaire est affaibli, principalement chez les jeunes enfants, les personnes âgées, et les patients immunodéficients. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), *Streptococcus pneumoniae* est le quatrième micro-organisme en termes de mortalité dans le monde (World Health Organization, 2016). En effet, chaque année plus d'un million de personnes meurent à la suite d'une infection par cette bactérie. Au-delà de la mortalité imputée au pneumocoque, il est important de prendre également en compte le coût socio-économique des infections à pneumocoque en recrudescence partout dans le monde à cause de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques. En tant qu'exemple, le surcoût imputable à la résistance aux antibiotiques chez l'ensemble des bactéries est estimé à environ 35 milliards d'euros pour les Etats-Unis d'Amérique (World Health Organization, 2016).

1.3. Principaux champs d'études

Comme indiqué précédemment, les recherches scientifiques sur le pneumocoque ont eu un impact fort sur la biologie du XXème siècle, bien au-delà du seul champ d'étude de cette bactérie. Dans ce chapitre seront évoqués les différents champs de recherche actuels sur *Streptococcus pneumoniae*.

1.3.1. La virulence

Les **facteurs de virulence** sont tous les mécanismes mis en place par la bactérie qui ont comme conséquence l'infection et/ou la pathologie associée. Il peut s'agir de la protection contre les défenses immunitaires de l'hôte, de toxines attaquant les cellules de l'hôte, ou encore de mécanismes d'adaptation au milieu infecté.

Un des principaux facteurs de virulence chez le pneumocoque est la **capsule**. Il s'agit d'une épaisse couche de polysaccharides entourant la paroi de la bactérie. Cet élément est non essentiel à la survie du pneumocoque mais lui permet de se protéger des défenses immunitaires de l'hôte en cachant ses antigènes de surface, et d'adhérer aux cellules de l'hôte pour une invasion plus efficace. Le rôle majeur de la capsule dans la virulence du pneumocoque s'illustre par le fait qu'une très grande majorité des souches pathogènes possèdent une capsule, et qu'une bactérie dépourvue de capsule présente une virulence de plus d'un million de fois inférieure à celle d'une bactérie encapsulée en modèle murin (Avery and Dubos, 1931). Au sein de l'espèce il existe une très grande variété de structures chimiques de polysaccharides capsulaires, en terme de motifs saccharidiques, de nombre d'unités répétées, de types de liaisons chimiques entre les unités saccharidiques, ou encore de modifications chimiques de ces unités. Ces structures chimiques, qui confèrent aux différentes souches de pneumocoque des spécificités antigéniques majeures, sont utilisées pour classer ces souches par sérotypes. A ce jour, environ 90 sérotypes ont été référencés (Henrichsen, 1995).

Une autre structure connue pour son implication majeure dans la virulence est le pilus, un long filament protéique de plus de 1 μm de long attaché à la surface de la bactérie. Chez le pneumocoque, il existe deux types de pilus (pilus de type I ou II). Le pilus de type I, bien que non essentiel, favorise la colonisation de l'hôte en promouvant l'adhésion de la bactérie aux cellules de l'hôte (Barocchi et al., 2006). Les protéines nécessaires à la synthèse du pilus sont codées par les gènes de l'îlot de pathogénicité *rlrA*. Les pilines RrgA, RrgB et RrgC sont les briques de base du pilus. Elles sont liées à la membrane plasmique par leur segment transmembranaire. Comme un grand nombre de protéines extracellulaires, les pilines sont transloquées au niveau de la zone de division par le translocon Sec. Par la suite, les pilines seront associées de manière covalente par 3 transpeptidases, les sortases dites de classe C (SrtC-1, SrtC-2, SrtC-3). Selon le modèle actuel, la synthèse du pilus est initiée par le recrutement de RrgA qui se retrouvera au bout du pilus, et assurera une fonction d'adhésion. RrgA est ensuite associée à RrgB par SrtC-2. Par la suite, entre 100 et 200 exemplaires de RrgB sont associées par SrtC-1 et forment le corps du pilus. La polymérisation de RrgB peut être ponctuellement interrompue par l'insertion de RrgA par l'action successive de SrtC-3 et SrtC-2. La sortase SrtC-2 est également

impliquée dans la multimérisation de RrgA, conférant à la structure une plus grande avidité, et donc de meilleures capacités d'adhésion. Enfin, les trois sortases permettent l'ajout de la piline RrgC sur le corps du pilus nouvellement synthétisé pour terminer cette structure (El Mortaji et al., 2012; Manzano et al., 2008). De manière très intéressante, les pilines possèdent la capacité de former des liaisons covalentes intramoléculaires autocatalytiques permettant d'augmenter la résistance du pilus contre les agressions extérieures comme les enzymes de l'hôte. Le pilus de type II quant à lui est retrouvé chez quelques sérotypes émergents. Ce pilus, dont les protéines sont codées par un autre îlot de pathogénicité, est composé uniquement de pilines PitB associées entre elles par une liaison covalente formée par la sortase G-1. D'autres protéines jouent un rôle accessoire dans l'assemblage du pilus de type II, il s'agit de la piline PitA, de la sortase G-2 ainsi que de la peptidase du signal SipA. (Engholm et al., 2017; Khare and Narayana, 2017)

Parmi les facteurs de virulence impliqués dans la protection contre les défenses de l'hôte, on trouve la protéase ZmpA qui diminue la réponse humorale de l'hôte en clivant les anticorps IgA1 humains (Janoff et al., 2014). La protéine de liaison à la choline PspA, quant à elle, inhibe d'une part la liaison de la fraction C3 du complément à la surface de la bactérie, ce qui a pour conséquence l'échappement à l'opsonisation (Ren et al., 2003), et inhibe d'autre part la lactoferrine, une glycoprotéine bactériostatique retrouvée abondamment dans la salive et les larmes (Shaper et al., 2004). D'autres protéines vont permettre à la bactérie une meilleure adhérence aux tissus de l'hôte. C'est le cas par exemple de la protéine Pava qui a la capacité de se fixer à la fibronectine, un des composants de la matrice extracellulaire. La délétion du gène codant pour cette protéine entraîne une diminution de la charge bactérienne et augmente les chances de survie de l'hôte (Holmes et al., 2001).

Enfin, le pneumocoque ne possède qu'une seule toxine connue, la pneumolysine. Cette petite protéine cytoplasmique est libérée dans le milieu extérieur lors de l'autolyse du pneumocoque et forme des pores dans les cellules de l'hôte, ce qui a comme conséquence la lyse de ces cellules. Même si la pneumolysine joue un rôle important dans l'accès aux nutriments dans certains cas d'infections, la pathogénicité du pneumocoque provient majoritairement de sa capacité à proliférer au sein de l'hôte. Par exemple, la prolifération de la bactérie au niveau des méninges

provoque une inflammation tissulaire communément appelée méningite, qui peut entraîner une très forte fièvre, une hypertension intracrânienne, des troubles circulatoire, des ischémies ou encore des nécroses. C'est pourquoi 10 à 30% des méningites bactériennes entraînent des lésions neurologiques. La prolifération du pneumocoque dans l'appareil respiratoire entraîne quant à elle une inflammation responsable du remplissage des alvéoles pulmonaires par du liquide. Cela va entraîner des difficultés respiratoires qui peuvent être très graves (Pour une revue complète sur la virulence du pneumocoque et les défenses de l'hôte, voir Brooks and Mias, 2018).

1.3.2. La compétence

Streptococcus pneumoniae est une menace particulièrement importante pour la santé humaine du fait du nombre croissant de souches résistantes aux antibiotiques. Cela vient du fait que le pneumocoque possède une plasticité génétique particulièrement élevée. En effet, cette bactérie est capable d'intégrer du matériel génétique exogène à son génome, qu'il provienne de la même espèce ou non. Ce phénomène, appelé « **compétence** », est naturellement induit chez le pneumocoque en phase exponentielle de croissance par un peptide sécrété dans le milieu appelé **CSP (Competence stimulation peptide)** (Håvarstein et al., 1995). Le CSP interagit avec ComD, une protéine bitopique possédant un domaine histidine kinase cytoplasmique qui phosphoryle le facteur de transcription ComE. La forme phosphorylée de ComE induit la transcription d'une vingtaine de gènes précoces de la compétence, tels que les gènes des opérons *comAB* et *comCDE*, responsables de la sécrétion du CSP. Ce mécanisme « boule de neige » provoque une entrée en compétence rapide et intense. Parmi les gènes précoces de la compétence, *comX* code un facteur de transcription activant plus de 60 gènes impliqués dans l'entrée de l'ADN exogène et dans son intégration au génome. Dans le cas où de l'ADN est présent dans le milieu extérieur, la bactérie synthétise un pilus dit « de compétence » qui permet la capture de cet ADN par la cellule bactérienne. S'il n'y a pas d'ADN dans le milieu, le pneumocoque sécrète différentes autolysines pour lyser les cellules pneumococcales présentes à proximité (un phénomène appelé

« fratricide ») et récupérer l'ADN qui aura été libéré dans le milieu (Johnsborg and Håvarstein, 2009).

1.3.3. La résistance aux antibiotiques

La découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928 a été un événement majeur de santé publique au XXème siècle, bien qu'il ait fallu attendre 1940 pour que Howard Walter Florey et Ernst Boris Chain trouvent le moyen d'en produire à grande échelle. L'utilisation de la pénicilline en antibiothérapie sera très vite adoptée et sauvera la vie de millions de personnes, notamment pendant la seconde guerre mondiale. En 1967, la première souche de *Streptococcus pneumoniae* résistante à la pénicilline a été isolée (Hansman and Bullen, 1967). En seulement quelques décennies, la résistance à la pénicilline s'est propagée sur toute la planète, jusqu'à représenter en 2001 près de la moitié des souches infectieuses en France (INSV, 2017). L'utilisation massive et déraisonnée des antibiotiques est de loin le principal facteur de cette recrudescence. Il est intéressant de remarquer que plusieurs campagnes publicitaires ont été mises en place dans les années 2000 pour lutter contre l'abus des antibiotiques, ce qui a eu pour effet un recul important de la résistance aux antibiotiques.

Au vu de l'importance de ce problème, de nombreuses recherches sont menées tant sur le plan épidémiologique que biochimique pour comprendre les mécanismes de résistance et trouver de nouveaux traitements. Les antibiotiques **bêta-lactamines** (famille de molécules dont fait partie la pénicilline) ciblent des protéines de synthèse du peptidoglycane appelées « **Penicillin-Binding Proteins** » ou **PBPs** (voir le paragraphe 2.3.2.2 pour une description plus détaillée). Chez le pneumocoque, la résistance aux bêta-lactamines se base sur des mutations acquises par les gènes codant les PBPs, qui diminuent leur affinité pour ces antibiotiques. Ce mécanisme est grandement facilité par la capacité particulière que possède le pneumocoque à échanger du matériel génétique avec d'autres bactéries. De nombreuses bêta-lactamines ont été créés pour contrer cette résistance, mais quelques années après la commercialisation de chaque nouvel antibiotique, des souches résistantes apparaissent de manière systématique.

Les bêta-lactamines ne sont pas les seuls antibiotiques utilisés contre le pneumocoque, les macrolides par exemple sont également utilisés. Ces derniers entrent dans les bactéries et se fixent sur la sous-unité 50S des ribosomes, ce qui a pour effet d'inhiber la synthèse des protéines. Dans ce cas également, les souches infectieuses de pneumocoque présentent un fort taux de prévalence de résistance à cet antibiotique (entre 20% et 40%). La résistance contre les macrolides est basée sur deux mécanismes. Le 1^{er} est l'expression d'une pompe à efflux permettant de diminuer la concentration intracellulaire de l'antibiotique, et le 2nd est l'expression d'une enzyme responsable de la méthylation de l'ARN 23S du ribosome, entraînant une chute drastique de son affinité pour les macrolides (Klugman and Lonks, 2005).

Le problème majeur est que de plus en plus de souches combinant ces résistances sont observées, c'est pourquoi l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament) a mis en place une liste d'antibiotiques considérés comme derniers recours (La daptomycine ou les glycopeptides par exemple) dans le cas d'un échec de tous les antibiotiques courants (Liste des antibiotiques critiques, ANSM, février 2016). Ils sont considérés comme des derniers recours car leur emploi nécessite une surveillance particulière, et ne sont donc pas prescriptibles en première intention. Récemment, des souches échappant à des antibiotiques de dernier recours sont apparues également (Liu et al., 2016).

1.3.4. La division et la morphologie

Le pneumocoque est devenu ces dernières années une bactérie modèle pour étudier la division et la morphogénèse des **ovocoques**. Les ovocoques, dont font partie les entérocoques ou les lactocoques par exemple, sont des bactéries de forme ovoïde, à mi-chemin entre les bacilles (en forme de bâtonnets) et les coques (sphéroïdes). Bien que certains aspects des processus morphogénétiques soient conservés entre les bacilles, les coques et les ovocoques, des différences importantes existent (voir le paragraphe 2.3 pour une description plus détaillée de la morphogénèse des ovocoques) (Massidda et al., 2013; Philippe et al., 2014; Zapun et al., 2008).

2. Division bactérienne et morphogénèse

2.1. Généralités sur la morphologie des bactéries

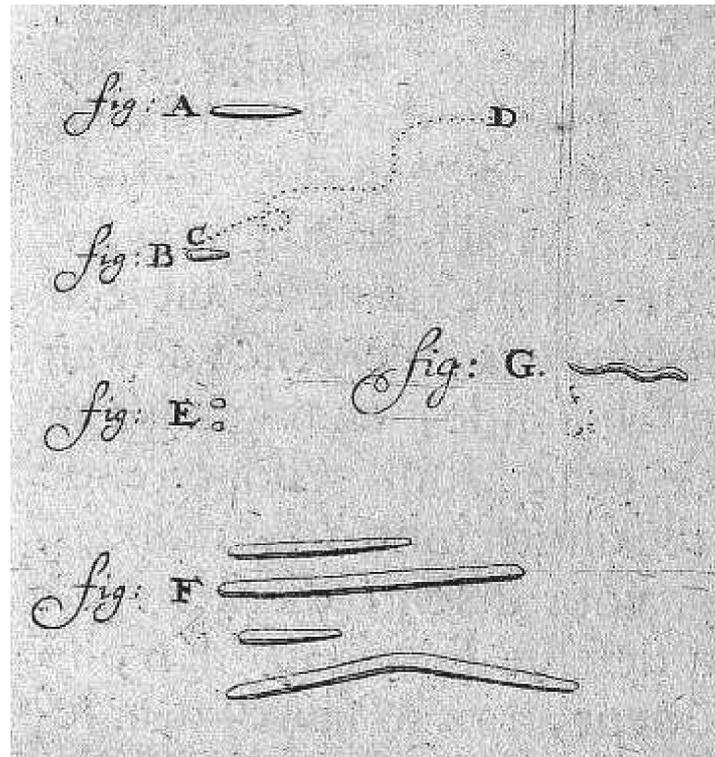


Figure 1 : Morphologie de bactéries de la plaque dentaire observées par Antoni van Leeuwenhoek. Ce dessin d'Antoni van Leeuwenhoek est issu d'une correspondance publiée le 12 septembre 1683. Il est accompagné du texte suivant : « Ce matin j'ai frotté ma dent avec du sel et rincé ma bouche avec de l'eau puis après avoir mangé j'ai lavé mes molaires avec un cure-dents ; ... J'ai alors pu voir, avec un grand émerveillement, que la dite matière comprenait de très petits animalcules vivants, se mouvant d'une jolie manière. Le plus gros spécimen observé avait un mouvement puissant et rapide, et piquait à travers l'eau comme un Brochet ».

2.1.1. Les différentes morphologies

2.1.1.1. Historique

Il est communément admis que les premières observations de bactéries ont été réalisées par Antoni van Leeuwenhoek, un riche marchand néerlandais qui améliora considérablement le microscope, inventé au début du XVII^{ème} siècle. Sa description de microbes de la plaque dentaire est restée célèbre jusqu'à nos jours (Fig. 1). A cette époque, bactéries, algues microscopiques, protozoaires ou même petits animaux étaient confondus dans le terme « Animalcules ». Il faudra attendre 1833 pour que Christian Gottfried Ehrenberg publie *Die Infusionstierchen als vollkommene Organismen*. Dans cet ouvrage, il sépare les bactéries de toutes les autres cellules. Par exemple, les bactéries appelées *Vibrionia* sont séparées en quatre genres différents : *Bacterium* (Bâtonnets rigides à mouvement vacillant), *Vibrio* (Corps filiforme, susceptible de mouvements ondulatoires comme un serpent), *Spirillum* (Corps filiforme, en hélice, inflexible), et *Spirochaete* (Corps en hélice, formant un long coron flexible).

Le classement des bactéries à cette époque était intimement lié à leur morphologie car aucune donnée métabolique n'était connue, et ce jusqu'à la découverte du rôle des bactéries dans la fermentation lactique par Louis Pasteur en 1857. A l'instar des animaux et des plantes, la morphologie des bactéries a été pendant très longtemps le principal critère permettant leur classification. Grâce au séquençage des génomes, il apparaît aujourd'hui que la morphologie d'une espèce est un critère largement insuffisant pour établir des liens phylogénétiques. En effet, de nombreuses bactéries ayant des morphologies similaires n'ont qu'un lien phylogénétique très lointain. Par exemple, les betaproteobactéries de morphologie hélicale *Rhodocyclus tenuis* et *Rubrivivax gelatinosus* ont été classées de manière erronée parmi les *Rhodospirillum* de par leur morphologie (Imhoff et al., 1998). De la même manière, les entérocoques ovoïdes *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* étaient initialement classés dans le genre *Streptococcus*. Après de nombreuses études comparatives sur la physiologie de ces bactéries et sur la séquence de leurs ARN ribosomiaux, il est apparu que ces deux espèces ne sont que lointainement apparentées au genre *Streptococcus* (Kalina, 1970; Schleifer and

Kilpper-Bälz, 1984). Il est intéressant de se demander si des espèces de morphologie similaire, mais de relation phylogénétique éloignée ont des mécanismes de morphogénèse similaires ou distincts.

2.1.1.2. Diversité des morphologies et implications biologiques

Depuis les premières observations de bactéries par Antoni van Leeuwenhoek, une variété impressionnante de formes bactériennes a été observée. En plus des formes simples **coques** (sphères) ou **bacilles** (bâtonnets), il existe des bactéries spiralées, courbées, branchées, se dotant d'appendices de toutes formes ou encore s'associant pour former des structures pluricellulaires (Fig. 2) (Kysela et al., 2016).

Il est intéressant de replacer les différentes morphologies dans le contexte évolutif, et de chercher à comprendre l'avantage sélectif que peuvent apporter ces différentes morphologies. Certaines bactéries de forme hélicale comme *Campylobacter jejuni* ont la capacité de se déplacer en exerçant un mouvement ondulatoire, ce qui leur apporte un avantage sélectif dans un milieu visqueux comme le mucus intestinal, principale niche de cette bactérie (Ferrero and Lee, 1988). De plus, la pression de sélection appliquée par la présence de prédateurs comme les protozoaires est un important facteur de diversité morphologique. Certaines bactéries sont par exemple devenues plus rapides, plus petites, ou alors au contraire sont devenues plus grosses ou plus longues. A cette importante pression de sélection peut s'ajouter la pauvreté du milieu en nutriment. En effet, un meilleur rapport surface/volume permet une meilleure acquisition des nutriments par la cellule. Dans un environnement pauvre en nutriments, les bactéries vont donc avoir tendance à devenir plus petites, ou à produire des prolongements comme le pédicule des bactéries du genre *Caulobacter*. Chaque environnement possède donc différents éléments responsables d'une pression de sélection, et c'est la somme de ces pressions qui va être responsable de l'émergence de tous les phénotypes bactériens observés.

Au-delà de la diversité des morphologies adoptées par les bactéries, c'est le très grand nombre de mécanismes employés par ces organismes pour aboutir à ces formes qui est remarquable. La forme bactérienne est conférée par le **peptidoglycane (PG)**,

composant majoritaire de la paroi bactérienne (voir le paragraphe 2.3 pour une description détaillée du PG et de sa voie de synthèse). Un certain nombre de protéines impliquées dans les mécanismes fondamentaux de synthèse du PG sont largement conservées dans le règne bactérien tandis que d'autres, moins conservées, vont conférer des spécificités morphologiques à différentes espèces bactériennes.

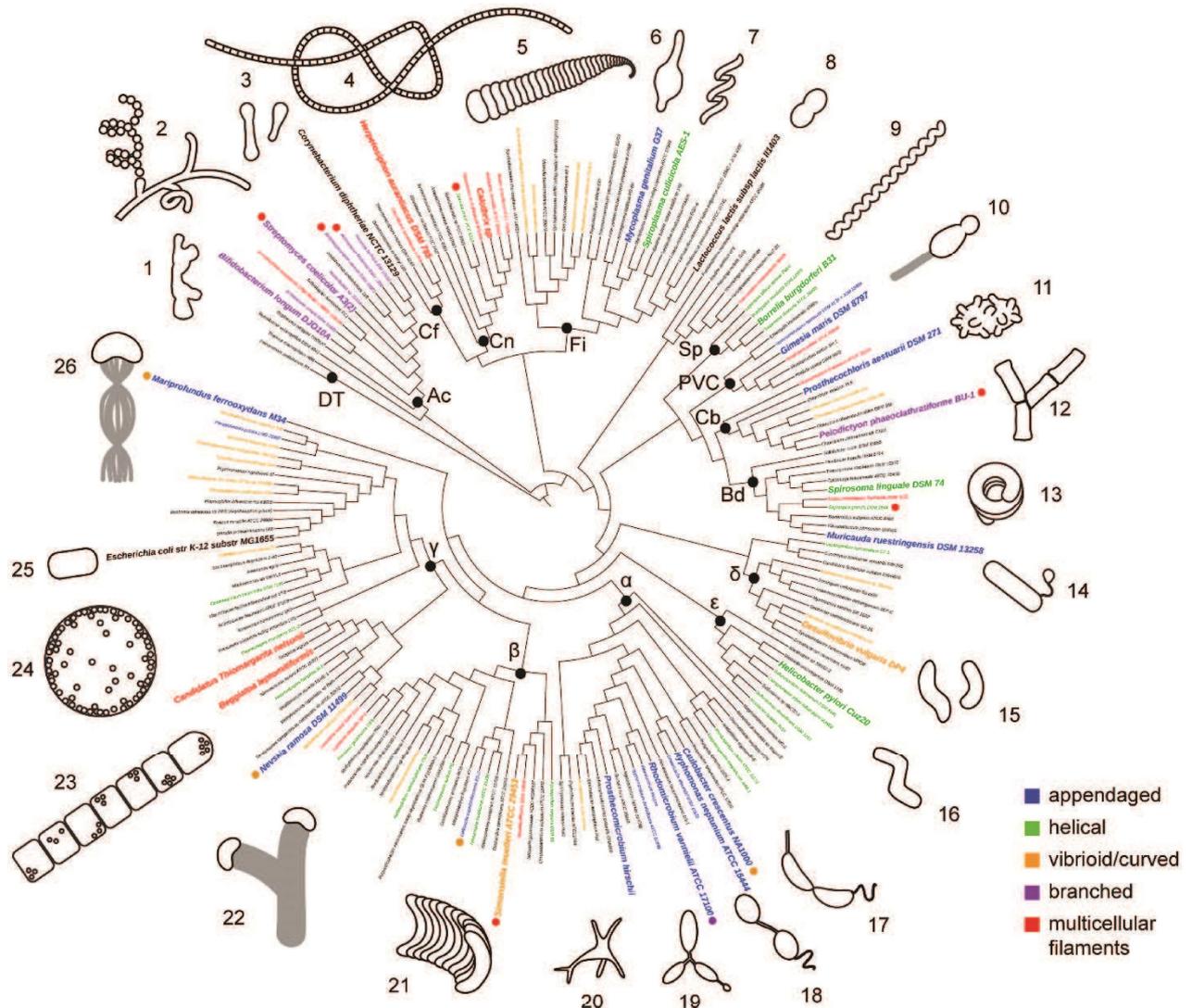


Figure 2 : Le règne bactérien possède une grande diversité de morphologies. Phylogénie bactérienne dérivée de la séquence des génomes pour les espèces sélectionnées. Chaque taxon morphologiquement et phylogénétiquement différent est représenté par un schéma de sa morphologie (échelle non représentative de la taille réelle des bactéries). Les points noirs représentent les nœuds majeurs dans la phylogénie des taxons représentés. Les points colorés indiquent des espèces aux morphologies multiples. DT, Deinococcus-Thermus; Ac, Actinobacteria; Cf, Chloroflexi; Cn, Cyanobacteria; Fi, Firmicutes; Sp, Spirochetes; PVC, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae; Cb, Chlorobi; Bd, Bacteroidetes; α , β , γ , δ , ϵ , subdivisions des protéobactéries. (Figure issue de Kysela et al., 2016)

2.1.2. La paroi bactérienne

Les organismes pluricellulaires possèdent généralement des cellules différenciées qui forment une barrière protectrice entre eux et le milieu extérieur. Les êtres unicellulaires, comme les bactéries, ont eux aussi besoin d'une protection contre les agressions chimiques ou biologiques, ou contre leur pression osmotique interne. Chez les bactéries, cette protection est assurée par la paroi qui recouvre la membrane plasmique. Le composant majeur de la paroi est le PG. Il s'agit d'une macromolécule composée de chaînes glycanes réticulées entre elles par de courts peptides. Le PG et sa synthèse seront détaillés dans le chapitre 2.3.2.

Après l'invention en 1882 par Robert Koch et Paul Ehrlich d'une méthode pour détecter spécifiquement le bacille de Koch, le docteur Christian Gram développa une méthode de marquage différentiel de la paroi des bactéries (Gram, 1884). Cette méthode est basée sur le marquage du PG par le violet de gentiane, suivie d'une décoloration à l'alcool. Les bactéries peuvent ainsi être classées en deux catégories, les bactéries à **Gram positif** (Gram +) qui retiennent le colorant, et les bactéries à **Gram négatif** (Gram -) qui n'en sont pas capables. Cette différence est expliquée par la structure de la paroi de ces bactéries.

Les bactéries Gram + possèdent une épaisse couche de PG (environ 15 à 30 nm) qui rend inefficace la décoloration par l'alcool. Par ailleurs, des macromolécules appelées acides téichoïques sont enchâssées dans le PG et peuvent représenter jusqu'à 50% de la paroi des bactéries Gram + (Neuhaus and Baddiley, 2003). Les acides téichoïques sont essentiels à la survie de la bactérie et possèdent des fonctions variées. Ils sont impliqués dans la protection contre les molécules anti-microbiennes, dans l'homéostasie des cations ou encore dans l'attachement de nombreuses protéines extracellulaires.

Les bactéries Gram - ne possèdent qu'une faible épaisseur de PG (environ 3 à 5 nm) surmontée d'une membrane externe. Cette membrane externe est une double couche de lipides contenant une macromolécule appelée le **LPS** (**L**ipopolysaccharide). Le LPS, fortement immunogène, possède une activité endotoxinique et induit l'inflammation lors d'une infection bactérienne par des bactéries Gram -.

Dans de rares exceptions, la coloration de Gram n'est pas indicative de la structure de l'enveloppe cellulaire, comme chez les mycobactéries qui apparaissent Gram - car elles ne possèdent pas de véritable paroi, mais sont dépourvues de membrane externe.

2.2. Mécanismes impliqués dans la division

Dans ce chapitre, je vais décrire succinctement les principaux mécanismes que les bactéries mettent en œuvre pour se diviser. Les points communs et les différences entre les espèces seront mentionnés afin d'avoir un point de vue général sur ces mécanismes. Ces étapes chez *Streptococcus pneumoniae* seront décrites plus loin dans le manuscrit.

2.2.1. Réplication et ségrégation du matériel génétique

La réplication de l'ADN peut être considérée comme l'étape la plus importante de la division bactérienne car elle représente le but ultime de la division, la transmission de l'information génétique de la cellule mère à ses cellules filles. C'est pour cela que la grande majorité des bactéries partagent les mêmes mécanismes pour la réplication de leur matériel génétique. Une protéine essentielle pour la réplication de l'ADN, appelée DnaA, est retrouvée chez toutes les bactéries. DnaA est une ATPase qui, sous sa forme liée à l'ATP, forme des hélices qui reconnaissent des zones riches en A/T à l'origine de réplication du chromosome bactérien, appelé OriC. Ce complexe nucléoprotéique permettra le déroulement de l'ADN dans cette zone, ce qui entraînera le recrutement de toutes les protéines nécessaires pour l'initiation de la réplication (Kaguni, 2006; Katayama et al., 2010). Les protéines impliquées dans ce mécanisme vont former deux fourches de réplication, une de chaque côté d'OriC, qui vont se rejoindre et se dissocier au niveau du site de terminaison de la réplication, appelé Ter.

Pour transmettre le matériel génétique aux cellules filles, la cellule mère doit non seulement répliquer son chromosome, mais également répartir équitablement l'ADN produit par la ségrégation du chromosome. Pour effectuer cela, les bactéries

possèdent différents mécanismes. Il a tout d'abord été montré que la seule entropie expliquerait en partie pourquoi les deux chromosomes se dirigent chacun vers une des deux cellules filles (Jun and Mulder, 2006). Cependant, les simples lois de la physique ne permettent pas à elles seules une ségrégation efficace et robuste des chromosomes, d'autres mécanismes sont employés par les bactéries pour effectuer cette tâche. Les systèmes ParABS et SMC, bien que non essentiels, permettent une ségrégation efficace des chromosomes chez un grand nombre de bactéries. Ils sont connus pour condenser le chromosome sur lui-même, ce qui permet une séparation plus simple des deux chromosomes issus de la réplication (Hajduk et al., 2016). *E. coli*, qui ne possède pas le système ParABS, présente un système homologue au SMC appelé MukBEF. En plus de son rôle de condensation du chromosome, MukBEF s'associe à la topoisomérase IV pour permettre la décaténation de l'ADN (Nicolas et al., 2014).

2.2.2. Détermination du site de division

Pour que le matériel génétique soit efficacement partitionné entre les deux cellules filles, il faut que le site de division soit correctement déterminé. Un défaut de localisation de la zone de division résultera en des cellules dépourvues de matériel génétique, ou présentant une morphologie aberrante et bien souvent non viables. Les espèces bactériennes ont mis en place différents mécanismes pour localiser cette zone de division.

Le mécanisme le plus connu est basé sur les protéines MinC et MinD. MinC interagit directement avec FtsZ, la protéine majeure de la division bactérienne, et inhibe sa polymérisation (Dajkovic et al., 2008). MinC est elle-même liée à la protéine MinD qui est une ATPase associée à la membrane par une hélice amphiphile. Chez certaines bactéries comme *E. coli*, il existe une protéine appelée MinE qui forme un anneau et provoque le détachement de MinD de la membrane en stimulant son activité ATPase. Une fois dans le cytoplasme, MinD fixe une nouvelle molécule d'ATP et se relocalise à la membrane à l'autre pôle de la cellule. Ces interactions entre MinE et MinD sont responsables d'un mouvement d'oscillation de pôle en pôle du complexe MinCDE, ce qui a pour effet de diminuer statistiquement la présence du

complexe au milieu de la cellule, et donc d'y permettre la localisation de FtsZ (Lutkenhaus, 2007). Chez d'autres bactéries comme *B. subtilis*, MinE n'est pas présente. Cependant MinD interagit indirectement avec une autre protéine appelée DivIVA. **DivIVA est une petite protéine qui se localise dans les plus fortes zones de courbure de la membrane**, et est donc enrichie aux pôles de la cellule (Bramkamp et al., 2008). Dans cette situation, MinC sera également statistiquement moins présente au milieu de la cellule, favorisant la localisation de FtsZ dans cette région.

Un second mécanisme est appelé **occlusion du nucléoïde**. En effet, chez de nombreuses bactéries, une protéine se lie à des séquences spécifiques de l'ADN bactérien et va directement ou indirectement inhiber la polymérisation de FtsZ. Il peut s'agir de la protéine Noc chez *B. subtilis* (Wu et al., 2009) ou de SlmA chez *E. coli* (Cho et al., 2011). Les sites de fixation de Noc ou SlmA sont localisés sur l'ensemble du chromosome mais sont presque absents autour de l'origine de réplication. Cette dernière étant localisée au centre de la cellule, la polymérisation de FtsZ est inhibée dans toutes les régions occupées par le chromosome sauf au milieu de la cellule. Malgré l'importance de ces deux systèmes, ils ne sont pas essentiels à la croissance de la bactérie. De plus il a été montré que chez *B. subtilis*, l'anneau formé par FtsZ (appelé **l'anneau Z**) peut se former précisément au centre de la cellule en absence de MinCD et de Noc. Ces éléments tendent à montrer que ces deux systèmes ne constituent qu'une partie du mécanisme permettant à l'anneau Z de s'assembler au centre de la cellule (Rodrigues and Harry, 2012).

Au-delà de ces mécanismes dits de « régulation négative » retrouvés largement dans le règne bactérien, certaines espèces ont mis en place d'autres mécanismes pour localiser le site de division. Par exemple les actinomycètes comme *Streptomyces coelicor*, qui ne possède ni MinCD, ni Noc/SlmA, expriment la protéine SsgB qui stimule l'assemblage de l'anneau Z, et SsgA qui localise directement SsgB au centre de la cellule (Willemse et al., 2011). Un autre système de localisation positif du site de division a été découvert quelques années plus tard chez *Myxococcus xanthus*. En effet, cette bactérie ne possède aucun des systèmes de localisation connus, mais exprime la protéine PomZ qui se localise au futur site de division avant FtsZ et qui est nécessaire pour la bonne localisation de l'anneau Z (Treuner-Lange et al., 2013).

Chez *S. pneumoniae*, qui lui aussi est dépourvu des protéines MinCD et Noc/SlmA, une protéine de localisation positive a récemment été découverte, il s'agit de **MapZ** (également appelée LocZ) (Fleurie et al., 2014a; Holečková et al., 2015). Cette protéine se localise à l'équateur de la cellule, et permet le recrutement de FtsZ à cet endroit. Lorsque la cellule commence à s'allonger, l'anneau formé par MapZ se sépare en deux anneaux qui vont rester positionnés à l'équateur des deux futures cellules filles. Lorsque la phase de constriction de la cellule mère débute, un troisième anneau de MapZ réapparaît au site de division parental et persiste jusqu'à la séparation complète des deux cellules filles.

2.2.3. Constriction de la membrane

La constriction de la membrane cytoplasmique est nécessaire à la formation de deux compartiments cellulaires qui deviendront les cellules filles. Une des protéines contribuant de façon essentielle à la constriction de la membrane est la **GTPase FtsZ**, un homologue bactérien de la tubuline. Lorsqu'elle se lie au GTP, FtsZ oligomérise en protofilaments s'assemblant en une structure annulaire au site de division, l'**anneau Z** (Bi and Lutkenhaus, 1991; Erickson et al., 1996). Chez le pneumocoque, l'anneau Z s'assemble au tout début du cycle cellulaire et permet le recrutement de nombreuses protéines de la division, dont les protéines de synthèse du PG.

En plus de son rôle de plateforme d'assemblage pour les protéines de la division, l'anneau Z est depuis longtemps considéré comme responsable de la constriction de la membrane. FtsZ est une protéine soluble indirectement liée à la membrane par l'intermédiaire de **FtsA**. Il a été montré que des forces de constriction peuvent être appliquées à des vésicules lipidiques par la seule présence de FtsZ fusionnée à la région d'ancrage membranaire de FtsA (Osawa et al., 2008). De nombreux modèles ont été proposés pour expliquer le rôle de FtsZ dans la constriction, impliquant par exemple la dynamique de polymérisation (lorsque FtsZ se lie au GTP) et de dépolymérisation (lorsque FtsZ hydrolyse le GTP en GDP) des filaments de FtsZ. L'un de ces modèles propose que la forte courbure des protofilaments de FtsZ liés au GDP pourrait exercer des forces de constriction locales sur la membrane (Li et al., 2013).

Cette observation rentre toutefois en conflit avec le fait qu'une diminution drastique de l'activité GTPase de FtsZ n'affecte pas la vitesse de fermeture du septum (Coltharp et al., 2016; Erickson et al., 1996; Yang et al., 2017). Une conformation de courbure intermédiaire est également observée en équilibre avec la conformation droite, en présence d'agents épaississants (mimant l'encombrement du cytoplasme) tels que le polyvinyl alcohol (PVA), la méthylcellulose (MC) ou le Ficoll (Popp et al., 2009; Erickson and Osawa, 2017). Cette conformation est également favorisée en présence de GTP et d'EDTA, ce dernier permettant d'inhiber l'activité GTPase de FtsZ (Chen et al., 2005). Ces observations parfois contradictoires sont à l'image du très grand nombre de données sur les différentes conformations des protofilaments de FtsZ, rendant leur interprétation particulièrement confuse. Il reste donc un grand travail à fournir pour comprendre comment FtsZ participe à la constriction de la membrane.

Depuis quelques années, l'idée selon laquelle la force déployée par FtsZ ne serait pas suffisante pour constrire la membrane a émergé et a donné lieu à des travaux d'une importance capitale. En effet, s'il a été montré que FtsZ était capable d'invaginer des liposomes (Osawa et al., 2008), cela ne tient pas compte de la pression osmotique présente à l'intérieur des bactéries. Pour exemple, la pression osmotique exercée sur une cellule de *B. subtilis* a été estimée aux alentours de 1.9 MPa (Whatmore and Reed, 1990), ce qui correspond à 10 fois la pression dans un pneu de voiture. D'autres mécanismes doivent donc exister pour permettre la constriction de la membrane bactérienne. Récemment, un article a démontré chez *E. coli* qu'une diminution importante de la dynamique de l'anneau Z n'affectait pas la constriction de la membrane, alors que la diminution de la synthèse du PG septal affectait drastiquement ce processus (Coltharp et al., 2016; Yang et al., 2017). Ce travail a permis de proposer un modèle dans lequel la synthèse du PG septal, qui est plus rigide que la membrane de la bactérie, pousse la membrane vers l'intérieur.

2.2.4. Synthèse du peptidoglycane

Nous avons vu dans un chapitre précédent que toutes les bactéries ont besoin pour leur survie d'une paroi composée en grande partie de PG. Du PG va donc devoir être produit à chaque cycle cellulaire pour permettre à la cellule mère de se séparer en deux cellules filles. Ce mécanisme étant essentiel pour la prolifération et la survie des bactéries, un cœur de protéines impliquées dans la synthèse du PG est retrouvé chez presque toutes les espèces.

Les étapes menant à la synthèse du PG peuvent être regroupées en 3 catégories : 1) la **synthèse du précurseur du PG - le lipide II** (voir paragraphe 2.3.1) - qui a lieu dans le cytoplasme, 2) la **translocation** de ce dernier à la surface de la cellule, et 3) les dernières étapes d'assemblage qui incluent la polymérisation des chaînes glycanes par une réaction de **transglycosylation** et la **transpeptidation** des chaînes peptidiques (voir paragraphe 2.3.2). Une fois synthétisé, le PG peut être le siège de modifications (voir paragraphe 2.3.3) permettant la régulation de l'activité de certaines enzymes associées au PG.

2.2.5. Rôle du cytosquelette bactérien dans la division

Toutes les bactéries possèdent des protéines de structure homologue aux protéines du cytosquelette eucaryote. Il existe des homologues bactériens de l'actine, de la tubuline, et des filaments intermédiaires qui sont en outre impliqués dans la morphogénèse. Malgré leur homologie structurale et des propriétés communes, elles ont bien souvent fortement divergé et possèdent des fonctions bien différentes entre les bactéries et les eucaryotes.

2.2.5.1. Les homologues de la tubuline (FtsZ et autres)

De nombreux homologues bactériens de la tubuline ont été découverts, mais le plus connu est sans conteste FtsZ (Löwe and Amos, 1998; Nogales et al., 1998), qui est présent chez la quasi-totalité des espèces bactériennes (Erickson and Osawa, 2010). FtsZ forme des protofilaments qui s'assemblent entre eux afin de former

l'anneau Z qui sert d'échafaudage pour un grand nombre de protéines de la division (Philippe et al., 2014). A l'instar de la tubuline, FtsZ possède un domaine d'hydrolyse du GTP, cependant ce n'est pas l'hydrolyse du GTP qui permet sa polymérisation, mais la fixation au GTP. Au contraire, l'hydrolyse du GTP par FtsZ entraîne la courbure du protofilament et sa dépolymérisation (Li et al., 2013).

D'autres homologues de la tubuline ont été découverts. Par exemple chez les bactéries appartenant au genre *Prostheco bacter*, les protéines BtubA et BtubB sont non seulement des homologues structuraux de la tubuline, mais possèdent également une identité de séquence avec la tubuline trois fois supérieure à celle de FtsZ (Jenkins et al., 2002). TubZ est un autre homologue de la tubuline retrouvé principalement chez les bactéries du genre *Bacillus*. Cette protéine est le moteur moléculaire d'un système de positionnement de plasmide (Larsen et al., 2007).

2.2.5.2. Les homologues de l'actine (MreB, FtsA et autres)

De nombreuses bactéries de forme allongée ont besoin de l'homologue bactérien de l'actine MreB, pour leur élongation (van den Ent et al., 2001; Jones et al., 2001). Alors que le pneumocoque ne possède pas cette protéine, *B. subtilis* en possède plusieurs homologues, de fonction partiellement redondante (Kawai et al., 2009). *E. coli* quant à elle ne possède qu'un seul homologue de MreB qui forme des doubles protofilaments anti-parallèles attachés à la membrane (Ent et al., 2014). En absence de MreB, *E. coli* est de forme arrondie et aucune mutation dans son génome n'a permis de restaurer sa forme, ce qui montre l'importance de cette protéine dans l'élongation de la bactérie (Kruse et al., 2004). Alors qu'il a longtemps été pensé que MreB formait une structure hélicoïdale, nous savons maintenant qu'elle forme des amas protéiques qui effectuent un mouvement de rotation dans la région cylindrique de la cellule ; ce mouvement est dépendant de la synthèse de PG (Domínguez-Escobar et al., 2011; Garner et al., 2011; Morgenstein et al., 2015).

FtsA, un autre homologue de l'actine, permet d'ancrer FtsZ à la membrane en interagissant d'une part directement avec FtsZ, et d'autre part avec la membrane à travers une hélice amphiphile (Szwedziak et al., 2012). FtsA forme des filaments en présence d'ATP ou d'ADP, bien que FtsA semble ne pas avoir d'activité d'hydrolyse

de l'ATP chez toutes les bactéries (Lara et al., 2004; Paradis-Bleau et al., 2005). Chez le pneumocoque, une légère déplétion de FtsA bloque la fermeture du septum, ce qui entraîne l'allongement anormal des cellules, et la présence de septa non achevés. De plus, sa forte déplétion bloque complètement la synthèse du septum, ce qui a pour effet une croissance isotropique de la bactérie (Mura et al., 2017).

D'autres homologues de l'actine ont été découverts qui jouent des rôles très divers comme la ségrégation des chromosomes pour ParM (Müller-Jensen et al.), ou encore le positionnement d'organelles pour MamK (Komeili, 2006).

2.3. La division du pneumocoque

Dans les chapitres précédents, nous avons décrit les mécanismes permettant la division bactérienne, et présenté quelques-unes des différences et spécificités entre quelques espèces bactériennes. Dans ce chapitre, nous rentrerons dans les détails de ces mécanismes chez le pneumocoque. Ce chapitre descriptif suivra un ordre chronologique, de la synthèse du précurseur du PG dans le cytoplasme jusqu'à la séparation des deux cellules filles.

2.3.1. La synthèse du lipide II

L'élément de base pour la synthèse du lipide II est l'uridine 5'-diphospho-*N*-acetyl-d-glucosamine (**UDP-GlcNAc**). L'UDP-GlcNAc est un produit issu d'une branche de la glycolyse. L'UDP-GlcNAc est produit à partir du glucose-6-phosphate, et sert de forme activée de la *N*-acétylglucosamine afin d'incorporer ce sucre dans un grand nombre de composés cellulaires comme le PG, le LPS ou les acides téichoïques chez les bactéries, mais également les glycoprotéines, les glycosaminoglycanes ou les mucopolysaccharides chez les mammifères (Milewski, 2002).

2.3.1.1. Les étapes cytoplasmiques de la synthèse du lipide II

La première étape de la synthèse du lipide II est le transfert d'un groupement enolpyruvate à partir d'une molécule de phosphoenolpyruvate (PEP) par l'enzyme appelée MurA (Fig. 3). Contrairement aux autres bactéries, les Gram + à faible teneur en GC (dont fait partie le pneumocoque) possèdent deux homologues de MurA, MurA1 et MurA2. Il a été montré que l'on pouvait inactiver l'un des deux gènes sans perte de viabilité, leur activité est donc redondante, mais la double délétion est impossible car leur activité est essentielle pour la bactérie (Du et al., 2000). La fosfomycine, qui est un antibiotique à large spectre utilisé majoritairement en cas d'infection urinaire, inactive MurA en établissant une liaison covalente avec sa sérine active (Kahan et al., 1974).

Par la suite, le résidu enolpyruvate est réduit en D-lactate par l'enzyme MurB (par l'utilisation du FADH₂ comme cofacteur), transformant ainsi l'UDP-GlcNAcEP en UDP-acide-N-acétylmuramique (UDP-MurNAc), la forme activée du MurNAc, le deuxième sucre présent dans le PG (Zoeiby et al., 2003). Très récemment, il a été montré que chez *Streptococcus suis*, une espèce proche du pneumocoque, le gène codant MurB est en opéron avec les gènes *potABCD*, codant des protéines impliquées dans l'import des polyamines. Cette structure est spécifique des streptocoques et implique une relation entre le transport des polyamines et la synthèse du PG dans ces bactéries. Il est intéressant de noter que l'inactivation du gène *potA* entraîne la surexpression d'un grand nombre de gènes de la division comme *murC*, *murE*, *murF*, *mreB*, *rodA*, *ftsW*, et *ftsX* (Liu et al., 2018).

Une fois l'UDP-MurNAc synthétisé, des enzymes vont ajouter séquentiellement les trois premiers acides aminés de la chaîne peptidique (Fig. 3).

MurC crée tout d'abord une liaison peptidique entre l'acide carboxylique de l'UDP-MurNAc et une L-alanine (Zoeiby et al., 2003). Chez le pneumocoque, il a été montré *in vitro* que MurC est un substrat de StkP, une serine/thréonine kinase, et de sa phosphatase associée, PhpP, indiquant un probable mécanisme de modulation de l'activité de MurC (Falk and Weisblum, 2013).

Par la suite, MurD catalyse la création d'une liaison peptidique entre la L-alanine et un D-glutamate (Zoeiby et al., 2003). De nombreuses recherches sont

menées afin de synthétiser un inhibiteur de MurD à des fins antibiotiques (Barreteau et al., 2012; Humljan et al., 2008; Kotnik et al., 2007; Tomašić et al., 2011; Zidar et al., 2010). Il est important de préciser que le D-glutamate est produit par **MurI**, une glutamate racémase, c'est-à-dire une enzyme qui produit un mélange équimolaire des formes D et L du glutamate. L'activité de MurI est essentielle pour la virulence de *Streptococcus mutans*, une espèce très proche du pneumocoque (Zhang et al., 2016).

Chez le pneumocoque, le troisième acide aminé est une L-lysine, ajoutée par l'enzyme **MurE** (Blewett et al., 2004). Par des expériences de croisement de souches entre *Streptococcus oralis* et *S. pneumoniae*, il a été montré que le simple transfert du promoteur de MurE d'une souche de *S. oralis* résistante aux bêta-lactamines à une souche sensible de *S. pneumoniae*, diminuait la sensibilité à la piperacilline et à l'oxacilline (Todorova et al., 2015). Ce résultat est étonnant, mais est cohérent avec d'anciens résultats identifiant MurE comme un important facteur de résistance à l'oxacilline chez *S. aureus* (Gardete et al., 2004).

La dernière étape cytoplasmique de la synthèse du lipide II est l'addition par **MurF** du dipeptide D-alanyl-D-alanine (D-Ala-D-Ala) (Turk et al., 2013). Ce dipeptide résulte de l'activité de deux enzymes cytoplasmiques : **Alr**, qui est une alanine racémase (Im et al., 2011), fournit la D-alanine (D-Ala) pour la seconde enzyme, **Ddl** ou D-alanyl-D-alanine ligase, qui établit la liaison peptidique entre les deux D-Ala. Alr et Ddl sont deux enzymes essentielles chez le pneumocoque, mais ne sont pas retrouvées chez l'humain, cela en fait des cibles de choix pour de futures molécules antibiotiques. La **D-cyclosérine** est un antibiotique de seconde ligne contre la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*, elle est structuralement proche de la D-Ala, et a pour effet l'inhibition à la fois de Alr et de Ddl (Prosser and de Carvalho, 2013).

2.3.1.2. Les étapes membranaires de la synthèse du lipide II

Une fois la chaîne pentapeptidique finie, **MraY** associe l'UDP-MurNAc-pentapeptide à un lipide particulier, l'**undecaprenyl phosphate**, qui servira d'ancrage membranaire au précurseur jusqu'à ce que ce dernier soit polymérisé à la surface de la cellule. L'undecaprenyl phosphate est un lipide possédant une chaîne polyinsaturée de 55 carbones obtenue par condensation de 11 unités isoprènes. A l'instar d'autres polyprenyl phosphate chez les eucaryotes par exemple, l'undecaprenyl phosphate est un excellent support pour la translocation des sucres à travers la membrane plasmique des bactéries. Il est impliqué dans la synthèse du PG, des acides téichoïques, du LPS, ou encore de la capsule par exemple (Manat et al., 2014). Le produit de la réaction catalysé par MraY est appelé **lipide I**.

Une fois synthétisé, le lipide I sert de substrat à **MurG**, une glycosyltransférase membranaire, qui va ajouter à l'acide-*N*-acétylmuramique du lipide I une molécule de *N*-acétylglucosamine (Ha et al., 2000). Cette dernière étape produit le précurseur du PG, le **lipide II**.

En supplément de cette chaîne de synthèse, d'autres enzymes vont modifier les précurseurs du PG afin de lui apporter des propriétés supplémentaires. Par exemple, les deux enzymes **MurT** et **GatD**, qui forment un hétérodimère, catalysent la conversion du D-glutamate du lipide I ou du Lipide II en D-iso-glutamine (Fig. 3) par le transfert d'une fonction amine partir d'une molécule de L-glutamine (Figueiredo et al., 2012; Münch et al., 2012). L'analyse du PG du pneumocoque montre que les peptides non amidés représentent 12.6% des peptides monomériques, alors qu'ils ne représentent que 1.8% des peptides dimériques (Bui et al., 2012). Nous pouvons donc supposer que l'amidation du D-glutamate est très importante pour la transpeptidation du PG. Cette hypothèse a été confirmée par la reconstruction *in vitro* de la synthèse du PG. En effet, le lipide II sous forme D-iso-glutamine est préférentiellement utilisé par les transpeptidases du PG (Zapun et al., 2013). Très récemment, la structure du complexe MurT/GatD de *S. pneumoniae* a été résolue, apportant des détails atomiques sur le mécanisme d'action de ces enzymes (Morlot et al., 2018).

Une autre modification des précurseurs du PG est l'ajout d'un ou plusieurs acides aminés sur la L-lysine en 3^{ème} position par les enzymes **MurM** et **MurN**,

généralisant des « **peptides branchés** » (Fig. 3). Dans un 1^{er} temps, l'amine ϵ de la L-lysine est substituée par une L-alanine ou une L-serine par MurM (Lloyd et al., 2008). Dans un 2nd temps, une L-alanine est ajoutée sur l'acide aminé précédent par MurN (De Pascale et al., 2008). Ces modifications ont lieu soit sur le lipide I soit sur le lipide II, mais ne peuvent avoir lieu sur les précurseurs solubles (Lloyd et al., 2008). La présence de peptides branchés a été associée à la résistance aux bêta-lactamines. En effet, certaines souches particulièrement résistantes à la pénicilline présentent un gène *murM* « mosaïque », c'est-à-dire contenant des portions de la séquence du gène *murM* de *Streptococcus mitis*, un proche cousin du pneumocoque. Cette mosaïcité entraîne une augmentation de l'activité de l'enzyme (Lloyd et al., 2008). De plus, la délétion de l'opéron *murMN* chez des souches résistantes à la pénicilline entraîne la perte totale de la résistance (Filipe and Tomasz, 2000).

Les protéines MurC, MurD, MurE et MurF sont des cibles de choix pour le développement de nouveaux antibiotiques car elles sont toutes essentielles pour la survie des bactéries, et ne possèdent pas d'homologues chez l'humain (Kouidmi et al.). De plus, elles possèdent des domaines dont les structures tertiaires présentent de fortes similarités. Enfin, leurs mécanismes enzymatiques sont bien connus, ce qui permet la recherche d'inhibiteurs de ces quatre enzymes. L'utilisation d'un seul inhibiteur pour plusieurs de ces protéines pourrait empêcher la survenue de résistances, car la même bactérie devra développer des mutations simultanément dans chaque enzyme ciblée par l'antibiotique (Kouidmi et al., 2014). Par exemple, certains composés inhibent à la fois MurC et MurD en reconnaissant le site de fixation de l'ATP de ces enzymes (Šink et al., 2008). Un composé inhibant les quatre protéines a même été synthétisé. Il agit directement sur le mécanisme catalytique de ces enzymes et semble très prometteur pour la conception d'une future molécule thérapeutique (Perdih et al., 2014).

Peptidoglycane

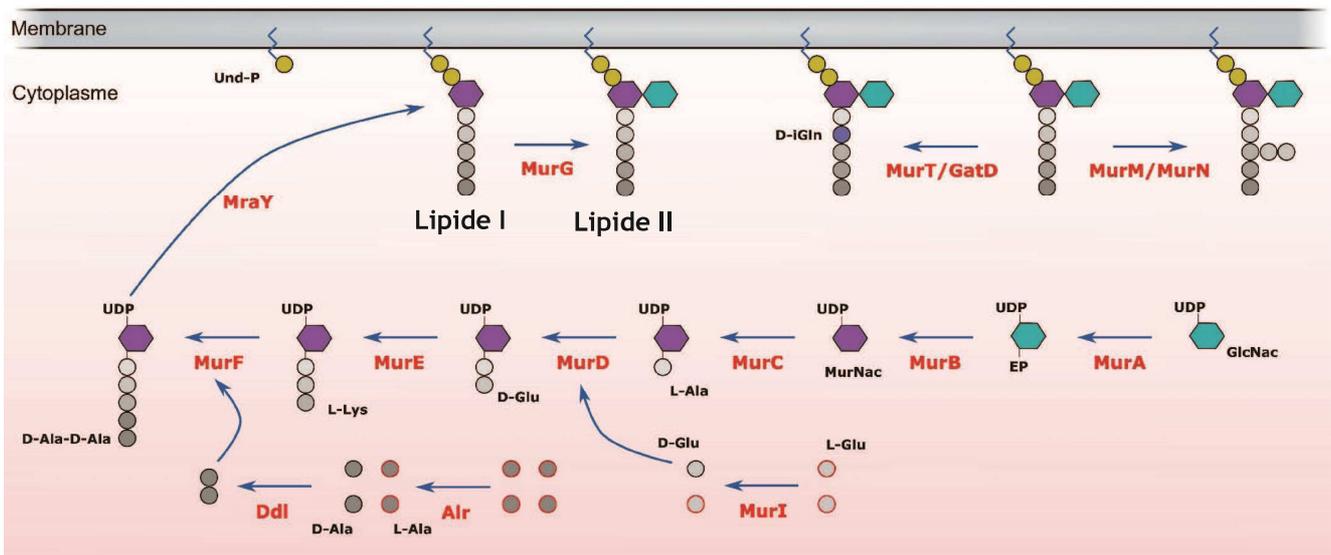


Figure 3 : La synthèse du lipide II a lieu dans le cytoplasme et implique de nombreuses enzymes. GlcNac : N-acétylglucosamine, UDP : Uridine-5'-diphosphate, EP : Enolpyruvate, MurNac : Acide N-acétylmuramique, Glu : Glutamate, Ala : Alanine, Lys : Lysine, Und-P : Undécaprényl phosphate, iGln : iso-glutamine

2.3.2. La synthèse du peptidoglycane

Nous venons de décrire la voie de synthèse du lipide II. Nous allons voir maintenant comment le pneumocoque utilise le lipide II pour la synthèse de son peptidoglycane.

2.3.2.1. La translocation du lipide II

La synthèse du lipide II étant cytoplasmique, il doit passer à travers la membrane plasmique pour pouvoir être utilisé à l'extérieur de la cellule. La partie non lipidique du lipide II étant conséquence et très hydrophile, nous pouvons supposer que son passage à travers la membrane nécessite l'action d'une protéine. Pour tester cette hypothèse, un dérivé fluorescent du lipide II, le 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl-lipide II (NBD-lipide II) a été inséré dans des liposomes. Le NBD-lipide II s'insère de manière homogène dans la bicouche lipidique, puis la fluorescence présente à l'extérieur est supprimée par un lavage au dithionite qui réduit le NDB en un composé non fluorescent. Si le lipide II était capable de traverser la bicouche de manière spontanée, la fluorescence devrait petit à petit diminuer en présence de dithionite au fur et à mesure que le lipide II serait exposé à l'extérieur. Cependant aucun événement de translocation n'a pu être observé par cette méthode, alors qu'elle a permis d'observer ce phénomène sur des vésicules dérivées d'*E. coli* (van Dam et al., 2007).

Les protéines permettant la translocation du lipide II vers la surface de la cellule sont appelées **flippases**. Leur identité a fait l'objet de nombreux débats ces dernières années et la question n'est pas encore tranchée. Il y a 30 ans la première protéine proposée fut **FtsW**, car cette protéine possède plusieurs segments transmembranaires, est toujours associée à une transpeptidase du PG et est essentielle à la division bactérienne (Höltje, 1998). Il a fallu attendre près de 15 ans pour obtenir les premières preuves expérimentales du rôle de flippase de FtsW. En effet, en utilisant la technique du NBD-lipide II présenté précédemment, il a été montré que 70% de la fluorescence était supprimée par le dithionite en présence de FtsW, contre environ 50% sans la protéine (Mohammadi et al., 2011). **RodA** est un paralogue de FtsW qui est impliqué dans l'élongation de nombreuses bactéries

(Matsushiji, 1994), c'est pourquoi on lui associe également le rôle de flippase. A ce jour toutefois, les activités flippase de FtsW et de RodA n'ont pas été démontrées expérimentalement *in vitro* ou *in vivo*. En revanche, il a récemment été montré que RodA possède une activité glycosyltransférase nécessaire à la synthèse du PG (Cho et al., 2016; Meeske et al., 2016). Bien que cela n'exclue pas un double rôle (flippase et synthase) de FtsW et RodA, il paraît aujourd'hui probable qu'une autre protéine transloque le lipide II à travers la membrane.

Aucune autre flippase du lipide II n'a été référencée chez le pneumocoque, cependant, plusieurs ont été découvertes chez d'autres bactéries. **MurJ** par exemple, est une protéine à 14 segments transmembranaires qui appartient à la superfamille des protéines exportrices de MOP (multidrug/oligo-saccharidyl-lipid/polysaccharide (Hvorup et al., 2003). Cette superfamille regroupe non seulement des exporteurs de drogues, mais également Wzx, la protéine responsable de la translocation des oligosaccharides couplés à l'undécaprenyl phosphate, précurseurs de la capsule du pneumocoque (Yother, 2011). Il a de plus été montré qu'une déficience en MurJ entraîne des défauts morphologiques chez *E. coli*, une diminution de la synthèse de PG, et une accumulation de ses précurseurs (Inoue et al., 2008; Sham et al., 2014). Chez *Bacillus subtilis*, la délétion du gène codant MurJ n'est pas létale mais le devient lorsque le gène codant la protéine AmJ est supprimé (Meeske et al., 2015). AmJ permet par ailleurs de compléter la délétion de MurJ chez *E. coli* (Meeske et al., 2015). AmJ ne présente de similarité ni avec MurJ, ni avec les autres protéines de la superfamille des MOP et il a donc été proposé qu'elle appartienne à une nouvelle famille de flippases.

Mis à part FtsW et RodA, aucune flippase du lipide II n'a été décrite chez le pneumocoque. Quelques souches semblent toutefois posséder un homologue de MurJ ou d'AmJ (recherche d'homologues protéiques avec la fonction « blast » de Uniprot : <https://www.uniprot.org/blast>). Il serait intéressant de rechercher la présence de MurJ et/ou AmJ par une analyse bioinformatique plus poussée et d'étudier le rôle de ces homologues de MurJ ou AmJ chez le pneumocoque.

2.3.2.2. La transglycosylation du lipide II

Le PG est composé d'une succession de chaînes glycanes (MurNAc-GlcNAc) réticulées par des peptides. Pour obtenir ce polymère, la cellule utilise le lipide II qui a été transloqué à la surface de la cellule et le polymérise en longues chaînes glycanes. Les chaînes peptidiques portées par le MurNAc sont ensuite réticulées par transpeptidation.

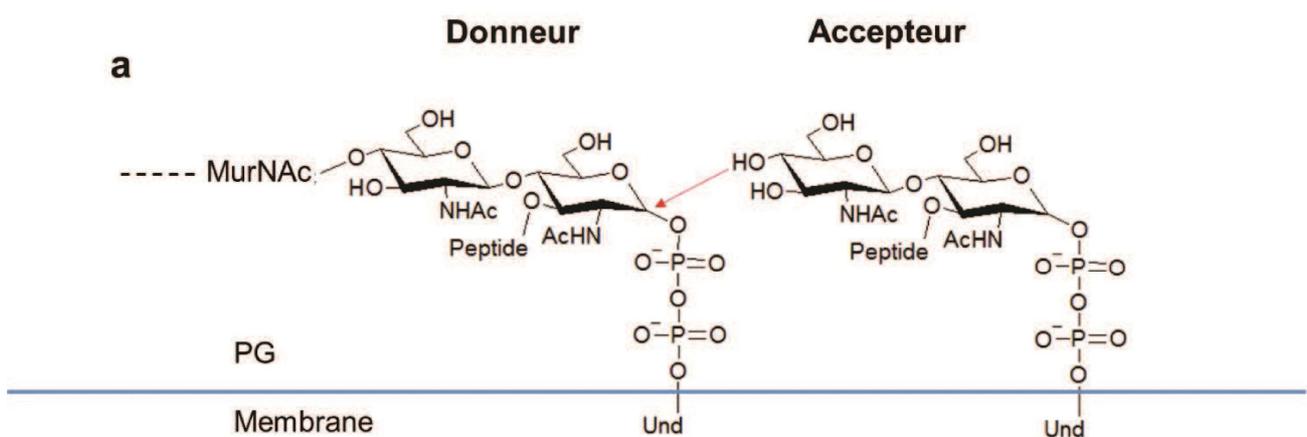
La polymérisation des chaînes de sucres est effectuée par les enzymes possédant une activité **glycosyltransférase (GT)**. Cette réaction consiste en la création d'une liaison β -1,4 entre le MurNAc de la chaîne glycane en croissance et le GlcNAc porté par le lipide II. La réaction commence par la déprotonation du groupement OH en position 4 du GlcNAc par le glutamate catalytique de l'enzyme, suivie par l'attaque nucléophile du carbone C1 du MurNAc (Fig. 4a) (Derouaux et al., 2013).

Les enzymes possédant une activité GT sont regroupées en deux classes : Les PBPs de classe A et les **SEDS (Shape, elongation, division and sporulation)**. Il existe 3 **PBPs de classe A** chez le pneumocoque, elles sont appelées **PBP1a**, **PBP1b** et **PBP2a** (Sauvage et al., 2008). Chacune de ces protéines peut être absente individuellement sans affecter la survie de la bactérie, mais la délétion simultanée des gènes *pbp1a* et *pbp2a* n'est pas viable, ce qui indique une redondance fonctionnelle entre ces deux protéines (Hoskins et al., 1999). Pendant de nombreuses années, les PBPs de classe A étaient les seules enzymes connues pour posséder cette activité, mais récemment il a été découvert que les SEDS participent activement à la synthèse des chaînes glycanes du PG (Cho et al., 2016; Meeske et al., 2016). Chez le pneumocoque, il existe deux protéines de la famille des SEDS: FtsW et RodA. Comme indiqué précédemment, ces deux protéines pourraient également être impliquées dans la translocation du lipide II (Mohammadi et al., 2011).

2.3.2.3. La transpeptidation du peptidoglycane

Une fois les chaînes glycanes polymérisées, elles sont pontées entre elles par transpeptidation de leurs peptides. Les protéines responsables de cette activité sont les PBPs de classe A et les PBP de classe B. En effet, les PBP de classe A possèdent deux domaines enzymatiques, un domaine possédant l'activité GT, et un domaine possédant l'activité **transpeptidase (TP)**. Les PBPs de classe B quant à elles ne possèdent qu'un domaine TP. Chez le pneumocoque, il existe deux **PBPs de classe B**, **PBP2b** et **PBP2x**, qui contrairement aux PBPs de classe A sont essentielles (Kell et al., 1993).

Le mécanisme de transpeptidation par les PBPs est très bien documenté, il a lieu en trois étapes (Fig. 4b). La première consiste en une association non-covalente et réversible entre l'enzyme et un pentapeptide, appelé brin donneur. Par la suite, la sérine catalytique de l'enzyme attaque la liaison peptidique entre les deux D-Ala terminales, ce qui a pour effet la création d'un acyl-enzyme entre la PBP et la D-Ala en position 4, et la libération de la D-Ala distale. Enfin, l'enzyme est déacylée tout en effectuant la transpeptidation de la D-Ala en position 4 avec la L-lys en position 3 d'un autre peptide, appelé brin accepteur (pour une revue de ce mécanisme (Goffin and Ghuysen, 1998)).



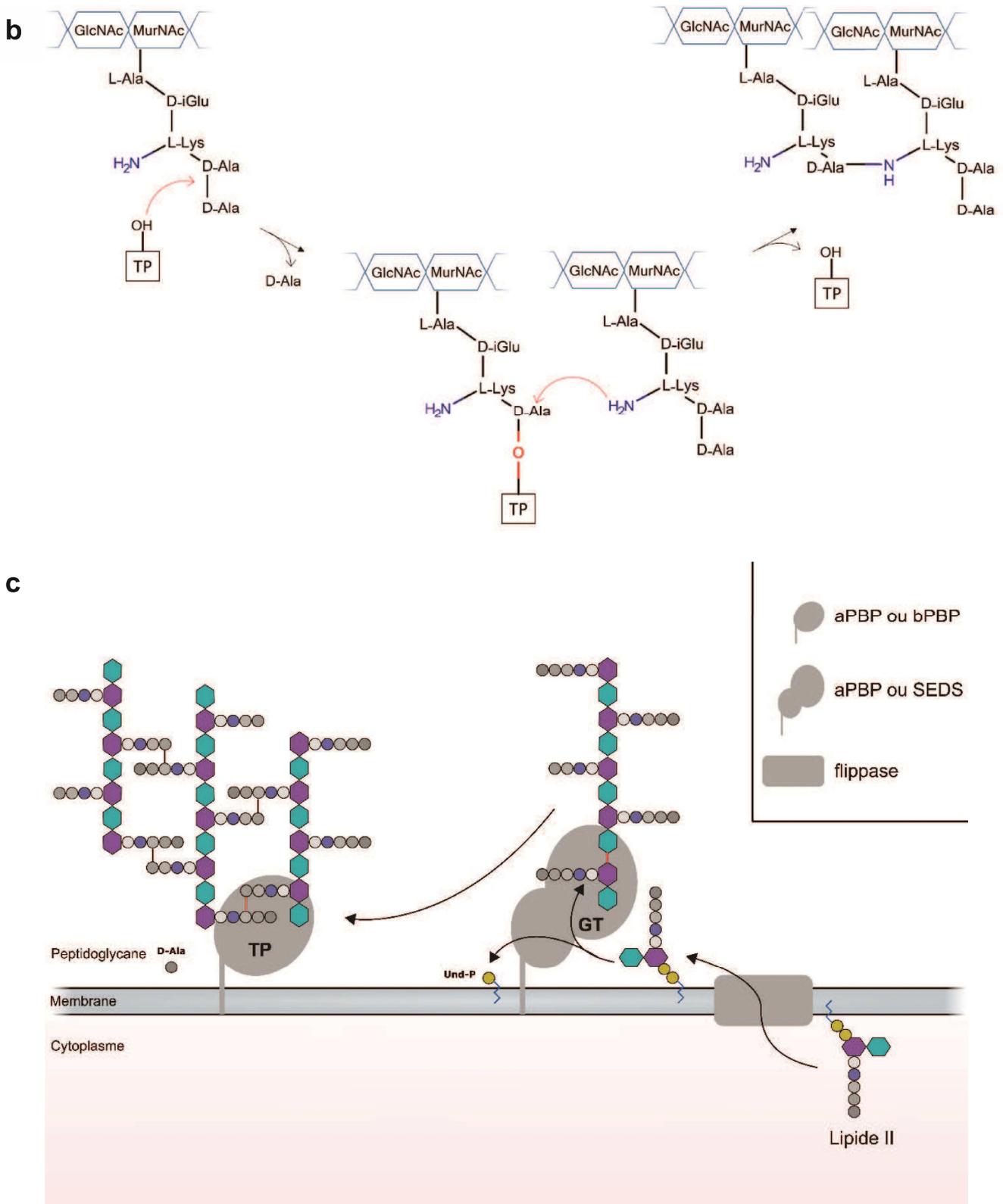


Figure 4 : Mécanismes moléculaires de la synthèse du PG. (a) Mécanisme de polymérisation d'une chaîne glycanne par une glycosyltransférase. (b) D-D-transpeptidation de deux chaînes peptidiques. (c) Schéma de la synthèse du PG à partir du lipide II. Ac = Acétyl, Und = Undecaprenyl, Und-P : Undecaprenol phosphate, GT : Domaine glycosyltransférase, TP : Domaine transpeptidase, D-Ala : D-alanine, aPBP : PBP de classe A, bPBP : PBP de classe B.

2.3.2.4. La maturation du peptidoglycane

Une fois le PG synthétisé, plusieurs mécanismes sont mis en place par la cellule afin de modifier sa composition et ses propriétés.

Modification des chaînes peptidiques

Une des modifications des chaînes peptidiques est la transformation des pentapeptides en tétrapeptides par **PBP3**, aussi appelé **DacA**, une PBP dite « de faible poids moléculaire » qui possède une activité D,D-carboxypeptidase. Le mécanisme catalytique de DacA est très proche de celui des autres PBPs, mais n'inclue pas l'étape de transpeptidation, ce qui a pour seul effet de cliver la liaison peptidique entre les deux D-Ala terminales (Goffin and Ghuysen, 1998; Morlot et al., 2005). Etant donné que la présence de l'alanine en position 5 du brin donneur est essentielle pour le mécanisme de transpeptidation par les PBP, la suppression de cet acide aminé par DacA rend le peptide inapte à servir de brin donneur pour les autres PBPs. Il a été montré qu'en absence de DacA la localisation des autres PBPs est affectée, ce qui provoque de gros défauts morphologiques (Abdullah et al., 2014; Morlot et al., 2004). De plus, DacA dans les cellules sauvages est localisée sur toute la surface de la cellule mais est exclue du site de division (Morlot et al., 2004). Ces données suggèrent que la présence de pentapeptides, restreinte au site de division, pourrait guider la localisation des PBPs. **DacB** est une métalloprotéase qui utilise comme substrat le tétrapeptide produit par DacA pour en faire un tripeptide. Il a été montré que ces deux protéines agissent séquentiellement et sont toutes deux importantes pour la division, mais également pour l'échappement du pneumocoque aux phagocytes, et à son adhérence à l'épithélium pulmonaire (Abdullah et al., 2014; Barendt et al., 2011; Zhang et al., 2015).

Modification des chaînes glycanes

Chez le pneumocoque, deux modifications de la chaîne glycanes du PG ont été détectées, l'acétylation du groupement OH porté par le carbone 6 du MurNAc (**O-acétylation**), et la déacétylation de l'azote porté par le carbone 2 du GlcNAc (**N-déacétylation**) (Fig. 5). La O-acétylation et la N-déacétylation, respectivement effectuées par Adr et PgdA, jouent un rôle dans la morphologie, la division cellulaire, la résistance au lysozyme, ou encore la formation de biofilm chez de nombreuses bactéries (Bonnet et al., 2017; Moynihan and Clarke, 2010). Par exemple, il a très récemment été montré chez le pneumocoque que l'absence d'Adr, donc l'absence d'O-acétylation du MurNAc, entraîne des défauts de division, la lyse prématurée des cellules par l'hydrolase du PG LytA durant la phase de croissance exponentielle, et une plus forte sensibilité aux β -lactamines (Bonnet et al., 2017).

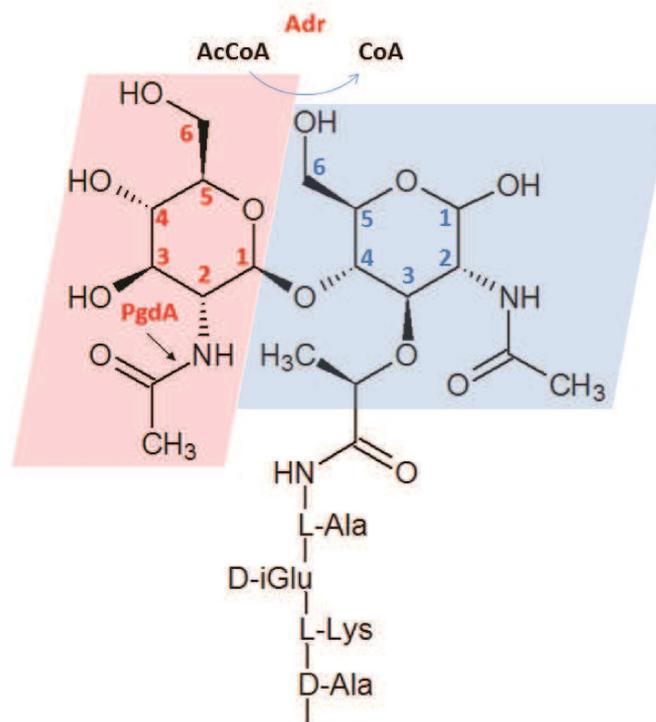


Figure 5 : Sous-unité de base du PG et modifications de la chaîne glycanes. La sous-unité de base du PG est composée de deux sucres, le GlcNAc (en rouge) et le MurNAc (en bleu), ce dernier supportant une chaîne pentapeptidique. Adr et PgdA sont les enzymes respectivement responsables de la O-acétylation et de la N-déacétylation du PG chez le pneumocoque.

2.3.3. L'hydrolyse du peptidoglycane

A l'image de PgdA, DacA ou DacB, évoquées précédemment, les **hydrolases du PG (CWHs** ou « **Cell wall hydrolases ») permettent soit de modifier sa structure, afin de lui conférer de nouvelles propriétés, soit de le détruire. Les CWHs sont impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires, le fratricide, l'autolyse, la division, ou encore la virulence. Plus d'une dizaine de CWHs ont été découvertes chez le pneumocoque, et alors que certaines ont été bien étudiées, les connaissances sur la plupart d'entre elles restent partielles.**

2.3.3.1. Les hydrolases du peptidoglycane impliquées dans la division

LytB

LytB est une glucosaminidase non-autolytique qui clive la liaison glycosidique GlcNAc-β(1,4)-MurNAc du PG (García et al., 1999; Rico-Lastres et al., 2015). Elle est impliqué dans la séparation des deux cellules filles à la fin de la division bactérienne, car en absence du gène *lytB*, *S. pneumoniae* forme de longues chaînes qui sont dispersées par l'ajout de LytB exogène (De Las Rivas et al., 2002). De plus, LytB est un facteur de virulence important pour le pneumocoque car elle est impliquée dans l'attachement aux cellules du nasopharynx, dans la constitution de biofilm, et dans l'échappement à la phagocytose par les cellules immunitaires (Moscoso et al., 2006; Ramos-Sevillano et al., 2011). LytB possède un domaine de liaison à la choline (**CBD** ou « **Choline-binding domain ») qui lui permet de se lier aux acides teichoïques présents dans la paroi du pneumocoque (De Las Rivas et al., 2002). Il est intéressant de remarquer que contrairement aux autolysines LytA et LytC, LytB n'a qu'une activité limitée sur le PG (De Las Rivas et al., 2002). En effet, LytB nécessite des conditions particulières pour être active, le GlcNAc du substrat doit être acétylé, et le muropeptide doit préférentiellement être non réticulé. De plus, la localisation polaire de la protéine est médiée par le CBD, mais sans intervention de la choline, ce qui suggère la présence d'un signal de localisation spécifique (Rico-Lastres et al., 2015).**

PcsB

PcsB est une hydrolase du PG dont l'activité exacte n'a pas encore été démontrée (Bartual et al., 2014). PcsB est essentielle dans les souches de *S. pneumoniae* D39 et R6, communément utilisées en laboratoire (Ng et al., 2004). La déplétion de PcsB dans la souche R6 de *S. pneumoniae* entraîne des phénotypes divers : morphologies allongées avec des septa non clivés pour une déplétion légère, et morphologies arrondies avec des septa mal positionnés et des défauts de séparation des cellules pour une déplétion sévère (Bartual et al., 2014). Il a par ailleurs été possible d'obtenir la délétion du gène codant PcsB dans d'autres souches telles que TIGR4 et plusieurs isolats cliniques. Ces souches de délétion ont une croissance considérablement ralentie et présentent une morphologie arrondie, un septum mal positionné et un défaut de séparation des cellules (Giefing et al., 2008). Dans la première étape de la division du pneumocoque, c'est-à-dire avant la constriction de l'anneau Z, PcsB est localisée aux pôles de la cellule et est exclue du futur site de division, mais une fois que la constriction a débuté, PcsB se relocalise au septum (Giefing-Kröll et al., 2011). L'ensemble de ces observations suggère que PcsB est impliquée dans le clivage du septum et le maintien de la morphologie ovoïde. Il a été montré que PcsB interagit avec FtsX, qui elle-même interagit avec l'ATPase FtsE (Sham et al., 2011). FtsEX est un complexe ressemblant à un transporteur ABC dont le rôle dans la régulation d'hydrolases du PG a été démontré chez *E. coli* (Yang et al., 2011). Un mécanisme d'autoinhibition de PcsB a été proposé sur la base de la structure cristalline d'un homodimère de la protéine, également observé en solution (Bartual et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs ont proposé que le complexe FtsEX permette de lever cette inhibition par un changement de conformation dépendant de l'hydrolyse de l'ATP.

MltG

Il a récemment été découvert que l'inactivation de la protéine MltG rendait la PBP de classe B PBP2b non essentielle chez le pneumocoque. Par prédiction de structure *in silico*, il semblerait que cette protéine soit une transglycosylase lytique (Tsui et al., 2016). Une transglycosylase lytique est une enzyme clivant la liaison glycosidique MurNAc-B(1,4)-GlcNAc du PG, produisant un GlcNAc et un 1,6-

anhydroMurNAc inutilisable par les transglycosylases. Chez *E. coli* il a été proposé que MltG clive les chaînes glycanes en croissance afin de réguler leur longueur, ce qui influencerait sur les propriétés physiques du PG (Yunck et al., 2016). Chez le pneumocoque, la souche de délétion du gène *mltG* a d'importants défauts de division car son temps de division est beaucoup plus long, et les cellules produites sont sphériques. Cette souche de délétion contient de nombreuses mutations qui inactivent la protéine PBP1a, ce qui indique une relation fonctionnelle entre MltG et PBP1a. De plus, une diminution de l'activité de MltG supprime l'essentialité des protéines impliquées dans l'élongation que sont PBP2b, MreC, MreD, RodZ et RodA. Un modèle a donc été proposé dans lequel MltG stopperait la polymérisation des chaînes glycanes par la machinerie d'élongation afin que ces chaînes puissent être transpeptidées par PBP2b (Tsui et al., 2016).

Pmp23

Sur la base d'homologies de séquences primaires et de prédiction de structures tertiaires, Pmp23 semble être une enzyme de la classe des lysozymes bactériens à laquelle appartiennent les protéines CwlT de *Staphylococcus aureus* et *Clostridium difficile* (Xu et al., 2014). Cette hypothèse est supportée par le fait que la mutation des acides aminés possiblement catalytiques (Glu61 et Asp68) provoquent les mêmes défauts morphologiques que la délétion du gène *pmp23*, c'est-à-dire des cellules plus longues, plus larges, et parfois de forme aberrante (environ 13% des cellules) (Pagliero et al., 2008) (Jacq et al., 2018). Observées en microscopie électronique, les cellules aux morphologies aberrantes possèdent des septa mal placés et parfois multiples. Dans toutes ces cellules, FtsZ, PBP2x et PBP2b présentent des localisations aberrantes telles que des structures annulaires asymétriques ou des hélices. Malgré ces localisations anormales, FtsZ, PBP2x et PBP2b restent toutefois colocalisées et la synthèse du PG reste active. Dans les cellules de dimensions élargies, une délocalisation partielle de MapZ sur l'ensemble de la surface cellulaire a par ailleurs été observée ; et dans les cellules déformées, MapZ présente des localisations aberrantes (structures en Y, agrégats, localisation diffuse sur l'ensemble de la cellule, position asymétriques). MapZ est impliquée dans le positionnement de l'anneau Z au site de division et sa localisation est dépendante

de son domaine de liaison au PG (Fleurie et al., 2014a). Toutefois, la capacité de MapZ à se lier au PG n'est pas affectée lorsque ce dernier n'est pas modifié par Pmp23, ce n'est donc pas l'action de Pmp23 qui guide la localisation de MapZ.

L'ensemble de ces données suggère plutôt que Pmp23 pourrait jouer un rôle de « contrôle de qualité » visant à corriger des erreurs introduites par les PBP lors de la synthèse du PG. Ce modèle est supporté par le fait que Pmp23 interagisse directement avec la transpeptidase PBP2x et que le PG présente un plus fort taux de réticulation lorsque Pmp23 est déletée. Dans ce modèle, la présence de chaînes de sucre improprement incorporées au PG préexistant (réticulation excessive, orientation incorrecte, ...) entraînerait la délocalisation partielle de MapZ à moins qu'elles ne soient dégradées par Pmp23. En absence du contrôle qualité effectué par Pmp23, la délocalisation de MapZ causerait une délocalisation subtile de FtsZ et des PBPs, causant dans un premier de légers défauts de forme. Ces légers défauts de localisation et de formes seraient ensuite rapidement amplifiés par la synthèse de PG active, menant à une structure anormale de l'anneau Z et des PBPs, et des défauts morphologiques sévères (Jacq et al., 2018, ayant été impliqué dans une partie de ce travail de recherche, cet article est mis en annexe du manuscrit).

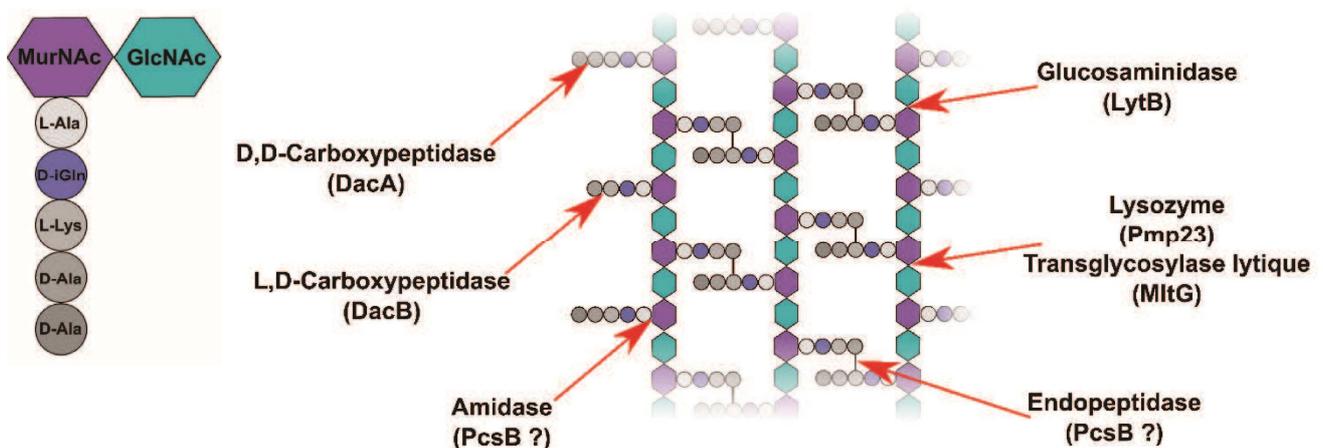


Figure 6 : Sites de clivage des hydrolases du PG impliquées dans la morphogenèse du pneumocoque. (A gauche) muropeptide pentapeptidique simplifié. GlcNAc : N-acétylglucosamine, MurNAc : Acide-N-acétylmuramique, L-ala : L-alanine, D-iGln : D-isoglutamine, L-lys : L-lysine, D-ala : D-alanine. (A droite) Schéma simplifié du PG, le code couleur est identique au schéma du muropeptide. Le site de clivage des hydrolases est indiqué par une flèche rouge. Les enzymes de la classe des lysozymes et des transglycosylases lytiques clivent la même liaison mais par un mécanisme différent : le lysozyme est une hydrolase qui restitue les résidus MurNAc et GlcNAc tels quels, alors qu'une transglycosylase lytique produit un GlcNAc et une molécule de 1,6-anhydroMurNAc (un MurNAc dont les groupes hydroxyles en positions 1 et 6 (voir Figure 5) ont subi une réaction de condensation pour donner un éther).

2.3.4. La régulation des machineries morphogénétiques

Nous avons vu jusqu'à présent la physiologie du PG, de sa synthèse à son hydrolyse, en passant par les différentes modifications qui peuvent lui être appliquées. Ces mécanismes doivent être finement régulés dans le temps et dans l'espace afin de préserver l'intégrité du PG et de maintenir la morphologie de la bactérie.

Comme évoqué précédemment, le pneumocoque est un ovocoque, c'est-à-dire un coque de forme ovoïde. Comme pour les autres bactéries, cette forme provient de l'activité combinée des enzymes de synthèse du PG, des hydrolases du PG et des protéines qui régulent la localisation et/ou l'activité des synthases et des hydrolases. Un modèle est communément accepté dans lequel deux machineries existent : l'une est en charge de l'élongation de la bactérie (l'**élongasome**), et l'autre est en charge de la division (le **divisome**) (Philippe et al., 2014; Sham et al., 2012). Comme évoqué dans le chapitre 2.2.5, ces machineries sont échafaudées par des protéines du cytosquelette. Chez les bactéries en forme de bâtonnet, les bacilles, l'élongasome est échafaudé par MreB tandis que le divisome est échafaudé par FtsZ (den Blaauwen et al., 2008; Erickson et al., 2010; Typas et al., 2011). Le pneumocoque, bien que possédant une machinerie d'élongation, ne possède pas la protéine de cytosquelette MreB. Il semble que FtsZ permette à la fois la mise en place de l'élongasome et du divisome car au moins au début du cycle cellulaire, la grande majorité de leurs composants suit la localisation de FtsZ, même lorsque cette dernière adopte une localisation aberrante (Fleurie et al., 2014b; Jacq et al., 2018).

Un cycle de division du pneumocoque peut être décrit en trois étapes. La 1^{ère} étape consiste en la mise en place de l'anneau Z et peu de temps après, des machineries de synthèse du PG. La cellule commence alors à s'allonger. La 2^{ème} étape commence lorsque la cellule entame sa constriction ; l'élongasome et le divisome vont alors se séparer au fur et à mesure que le septum se ferme. Enfin, lors de la 3^{ème} étape, les machineries morphogénétiques se relocalisent à l'équateur des deux futures cellules filles qui commencent la 1^{ère} étape de leur cycle de division pendant

que le septum parental s'achève et que les cellules filles finissent de se séparer (Fig. 7).

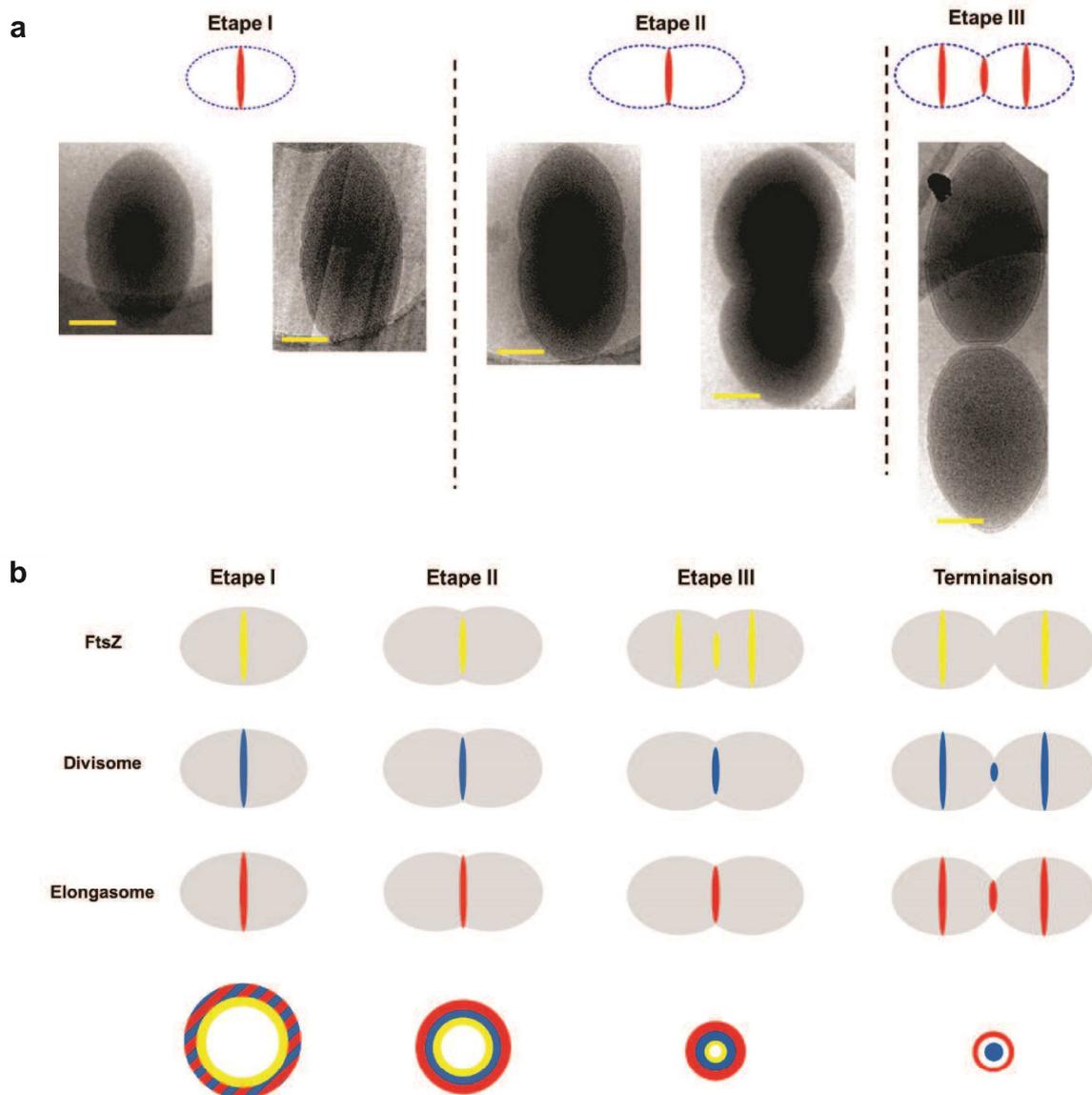


Figure 7 : Etapes de la division de *S. pneumoniae* et positionnement des machineries morphogénétiques. (a) Schématisation des trois étapes de la division et images représentatives pour chaque étape obtenues par microscopie électronique (crédits : Anne-Marie Di Guilmi et Guy Schoehn, IBS). Barre d'échelle : 500 nm. (b) Reconstitution de la localisation de l'anneau Z et des machineries d'élongation et de division (respectivement élongasome et divisome) à partir des données de microscopie de fluorescence issues de la littérature (Morlot et al., 2003 ; Land et al., 2013; Tsui et al., 2014). Les localisations sont représentées en projection radiale pour les trois premières lignes du schéma, et projection longitudinale pour la ligne du bas. Le code couleur est identique pour l'ensemble des 4 lignes : rouge : Elongasome, Bleu : divisome, Jaune : FtsZ.

2.3.4.1. Echafaudage par l'anneau Z

Mise en place de l'anneau Z

Comme évoqué précédemment, le pneumocoque ne possède aucun des mécanismes de localisation de FtsZ connus chez les autres bactéries. Cependant, une protéine a récemment été découverte jouant ce rôle, il s'agit de la protéine bitopique **MapZ** (également appelée LocZ) (Fleurie et al., 2014a; Holečková et al., 2015). MapZ se localise au futur site de division avant FtsZ, et la recrute grâce à une interaction très forte entre la partie cytoplasmique de MapZ et FtsZ. MapZ possède également un domaine extracellulaire qui se lie au PG. Une hypothèse propose que ce soit une composition en PG particulière au centre de la cellule qui permette le recrutement de MapZ à ce qui deviendra le site de division (Manuse et al., 2016). De plus, alors qu'il est connu que l'anneau Z est formé d'amas protéiques (Fu et al., 2010; Jacq et al., 2015; Strauss et al., 2012) qui effectuent un mouvement circulaire apparent autour du site de division (mouvement en « tapis roulant, voir Fig. 11 et (Bisson-Filho et al., 2017; Yang et al., 2017)), il a très récemment été montré que l'anneau formé par MapZ est immobile et sert de guide au mouvement des filaments de FtsZ (Li et al., 2017).

Un 2^{ème} mécanisme de localisation de l'anneau Z a été récemment proposé, il est lié à la ségrégation des chromosomes. Il a été montré que l'origine de réplication des chromosomes se déplace en même temps que MapZ, mais ne dépend pas de MapZ pour son positionnement. De plus, une perturbation de l'organisation longitudinale du chromosome entraîne un retard de localisation de MapZ et FtsZ (van Raaphorst et al., 2017). L'absence de MapZ ou la perturbation de l'organisation du chromosome affectent toutes deux la localisation de FtsZ mais cette dernière parvient toutefois dans la plupart des cas à trouver le centre de la cellule. Il semble donc qu'il y ait un autre ou d'autres mécanismes contribuant à la localisation de FtsZ. Il a récemment été montré dans mon laboratoire d'accueil que la composition lipidique de la membrane est différente en fonction de sa courbure. Cette composition

différentielle pourrait permettre la localisation de FtsZ au milieu de la cellule. En support de cette hypothèse, une modification de l'organisation des lipides par modification de la température entraîne une délocalisation réversible de l'anneau Z (Calvez and Zapun, manuscrit actuellement en soumission).

Ancrage de FtsZ à la membrane

Nous l'avons vu précédemment, FtsA est un homologue bactérien de l'actine qui ancre FtsZ à la membrane grâce à son hélice amphiphile. Chez les bactéries à Gram positif et les cyanobactéries, il existe une protéine appelée **SepF** qui semble être partiellement redondante avec FtsA (Hamoen et al., 2006). En effet, chez *B. subtilis*, SepF interagit directement avec l'extrémité C-terminale de FtsZ et possède une hélice amphiphile comme FtsA (Singh et al., 2008). De plus, il a été montré chez le pneumocoque qu'une surexpression de FtsA supprime partiellement les défauts de division d'une souche délétée de SepF. Chez *S. pneumoniae*, il semblerait toutefois que SepF soit recrutée plus tardivement que FtsA au site de division, et soit impliquée uniquement dans la septation contrairement à FtsA qui semble, à l'instar de FtsZ, impliquée à la fois dans la septation et dans l'élongation (Mura et al., 2017). *In vitro*, SepF de *B. subtilis* forme de larges anneaux qui sont capables d'associer

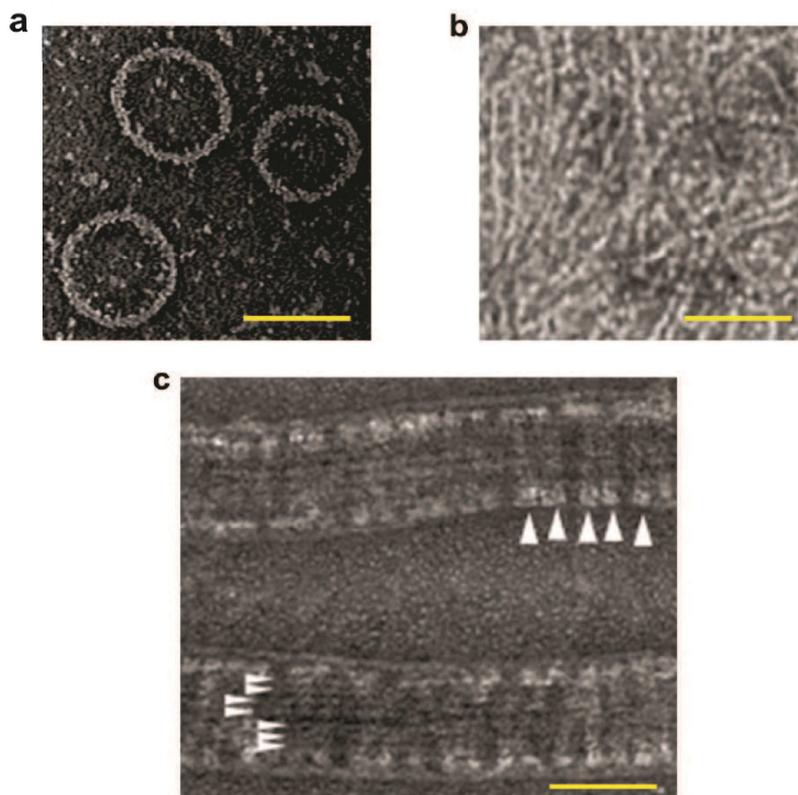


Figure 8 : Polymérisation de SepF de *B. subtilis* et association avec les filaments de FtsZ. (a) Polymères de SepF en solution observés par microscopie électronique. (b) Filaments de FtsZ en solution observés par microscopie électronique. (c) L'ajout de SepF aux filaments de FtsZ préformés permet l'association latérale des filaments en de long tubules rectilignes pouvant atteindre plusieurs micromètres. Les flèches blanches sur le tubule du haut indiquent les anneaux de SepF et les flèches blanches sur le tubule du bas indiquent les filaments de FtsZ. Barre d'échelle : 50 nm. D'après Duman et al., 2013.

latéralement les filaments de FtsZ pour former des faisceaux (Fig. 8) (Duman et al., 2013; Gündoğdu et al., 2011). En plus d'ancrer FtsZ à la membrane, les anneaux de SepF pourraient donc également favoriser l'association latérale des filaments de FtsZ, et être ainsi impliqués dans la formation des amas de filaments observés au sein de l'anneau Z (Jacq et al., 2015; Duman et al., 2013; Guan and Ye, 2018)

Architecture de l'anneau Z

De nombreux travaux de recherche indiquent que la structure annulaire appelée anneau Z est en fait un ensemble d'amas hétérogènes de FtsZ en rotation apparente autour de la cellule (Bisson-Filho et al., 2017; Fu et al., 2010; Jacq et al., 2015; Strauss et al., 2012; Yang et al., 2017). Chez *S. pneumoniae*, la composition granulaire hétérogène de l'anneau Z a été visualisée en PALM (Fig. 9a). Par ailleurs, cette étude a révélé un remodelage de la structure de l'anneau Z au cours de la phase de constriction. En effet, la diminution du diamètre de l'anneau s'accompagne d'un épaissement (~ 30 nm) de sa dimension axiale (Fig. 9c, panneaux du haut et

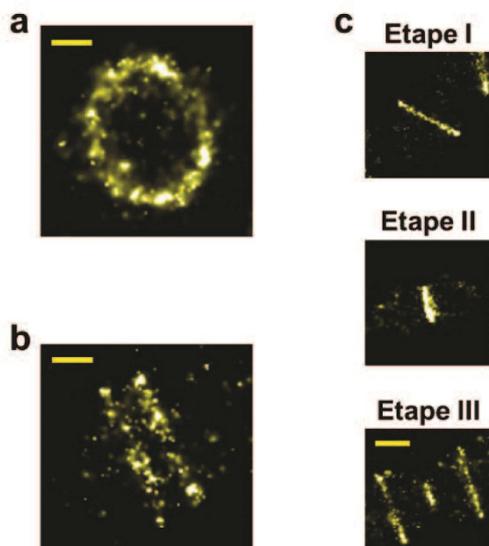


Figure 9 : Structure et remodelage de l'anneau Z chez *S. pneumoniae*. Images représentatives de cellules de pneumocoque exprimant un gène de fusion endogène *ftsZ-spdendra2* permettant l'observation par microscopie super-résolue PALM (pour une explication de la méthode voir chapitre 3.4.4). (a) Vue de dessus d'un anneau Z dévoilant sa structure granulaire hétérogène. (b) Vue de côté d'une structure en double anneau présente dans 4 % des cellules. (c) Vues de côté d'anneaux Z représentatifs de cellules à chaque étape de la division : Etape I (haut), Etape II (milieu), et Etape III (bas). Barre d'échelle : 250 nm pour (a) et (b) et 500 nm pour (c).

du milieu) alors que le nombre de molécules de FtsZ au sein de l'anneau reste constant au cours des étapes I et II. La constriction de l'anneau Z chez le pneumocoque n'est donc pas liée à la diminution du nombre de molécules de FtsZ dans l'anneau mais à un réarrangement spatial des molécules de FtsZ au sein de cet anneau. Lors de l'étape III, une partie des molécules de FtsZ présentes dans l'anneau Z se relocalise aux futurs sites de division des deux nouvelles cellules filles pour former les nouveaux anneaux Z (Fig. 9c, panneau du bas). Une nouvelle sous-structure a également été découverte, un double anneau Z, observé dans 4 % des cellules imagées (Fig. 9b). De nombreuses caractéristiques de ces double anneaux suggèrent qu'ils constituent un intermédiaire physiologique entre l'étape I et l'étape II du cycle cellulaire : 1) chaque anneau composant cette structure contient la moitié du nombre de copies de FtsZ présentes dans un anneau unique, 2) les double anneaux sont observés uniquement dans les cellules en phase pré-divisionnelle, 3) leur diamètre n'est pas aberrant et 4) les deux anneaux sont séparés par des distances variant de 50 à 300 nm, ce qui est de l'ordre de grandeur de la distance séparant les double anneaux de MapZ avant l'étape de constriction (Jacq et al., 2015).

Régulation de l'architecture de l'anneau Z

De nombreuses protéines sont connues chez toutes les bactéries pour réguler la structure de l'anneau Z. En effet, l'anneau Z a une structure très complexe, pas encore entièrement élucidée, et la régulation des interactions entre les monomères de FtsZ, entre les protofilaments, ou la régulation de leur dynamique de polymérisation/dépolymérisation sont essentielles pour que la division bactérienne se déroule correctement.

ZapA par exemple est une protéine dont le rôle chez *E. coli* est de réguler la structure de l'anneau Z. En effet, en absence de ZapA, les amas protéiques composant l'anneau Z sont plus petits et sont plus dynamiques (Buss et al., 2013). Il a récemment été montré que ZapA se localise au centre de la cellule indépendamment de FtsZ et interagit avec le chromosome par l'intermédiaire de **ZapB** et de **MatP**. Ainsi ZapA pourrait jouer un rôle dans la localisation de FtsZ et relier la réplication du chromosome à la division cellulaire (Buss et al., 2017; Männik et al., 2016).

EzrA a été découverte chez *B. subtilis* en analysant les mutations supresseurs d'une souche possédant un allèle thermosensible de *ftsZ* (Levin et al., 1999). EzrA est un régulateur négatif de l'assemblage de FtsZ, car en son absence de nombreux anneaux Z supplémentaires apparaissent dans les cellules (Levin et al., 1999). Il a été montré *in vitro* qu'EzrA est capable d'augmenter la concentration critique en FtsZ nécessaire à la formation de protofilaments, mais n'est pas capable de déstabiliser les filaments déjà assemblés (Chung et al., 2007; Haeusser et al., 2004). En plus de ce rôle précoce dans le cycle cellulaire, il a été montré chez *S. aureus*, *B. subtilis* et *S. pneumoniae* qu'EzrA connecte FtsZ, qui est cytoplasmique, aux protéines de synthèse du PG dont les domaines catalytiques sont localisés à l'extérieur de la cellule (Claessen et al., 2008; Fleurie et al., 2014b; Steele et al., 2011).

La structure d'EzrA a été résolue par cristallographie sous la forme d'un homodimère antiparallèle (Fig. 10) et a révélé son homologie structurale avec la spectrine, une protéine du cytosquelette eucaryote tapissant la membrane des cellules (Cleverley et al., 2014). Il est tout à fait possible que l'homodimère observé dans les cristaux soit physiologique car il a été montré par la méthode de double hybride bactérien que les régions N- et C-terminales de la protéine interagissent. Chaque monomère est composé de cinq répétitions d'un faisceau de triple hélices α et d'un faisceau de 4 petites hélices α comprenant un motif QNR qui semble important pour la localisation d'EzrA au site de division (Haeusser et al., 2007) et pour son interaction avec FtsZ (Land et al., 2014). EzrA présente un repliement en arc de cercle d'un diamètre de 12 nm. En plus de l'hélice transmembranaire N-terminale, le faisceau en position C-terminale pourrait jouer un rôle dans l'attachement d'EzrA à la membrane par sa composition riche en résidus hydrophobes. Les auteurs de cette étude ont proposé que si EzrA forme un homodimère antiparallèle, ce dernier soit positionné perpendiculairement à la membrane et ancré solidement par les 4 sites d'attachement (2 hélices transmembranaires + 2 faisceaux hydrophobes). La stabilité de cette conformation semble contre-intuitive compte tenu de la forte dynamique de l'anneau Z.

Les auteurs de l'étude structurale d'EzrA ont réalisé des expériences de modélisation moléculaire qui ont montré qu'il est possible d'accommoder un dimère FtsA-FtsZ à l'intérieur de l'arche formée par un homodimère d'EzrA (Fig. 10b). Cela permettrait

à EzrA de restreindre les interactions latérales entre les filaments de FtZ. Alternativement, FtsZ pourrait interagir avec le coté externe de l'arche et d'autres partenaires d'ErzA seraient accomodés à l'intérieur de l'arche.

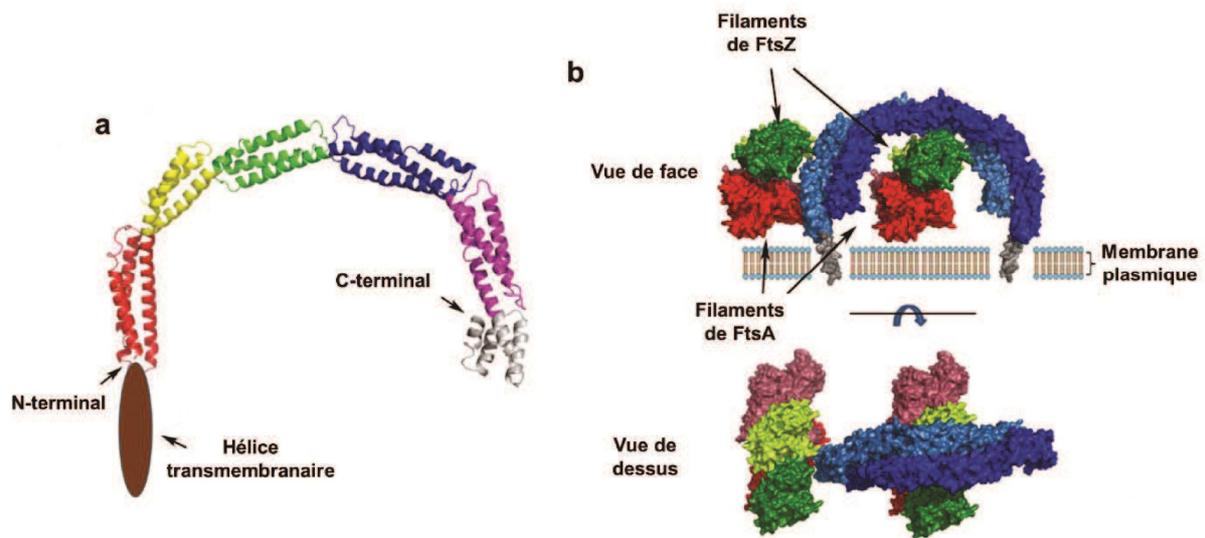


Figure 10 : Structure d'EzrA et modèle d'interaction avec ses partenaires FtsZ et FtsA. (a) Représentation en ruban de la structure de la région soluble de la protéine EzrA de *B. subtilis*. La position supposée de l'hélice transmembranaire de 21 résidus est indiquée par un ovale de couleur marron. (b) Modèle de positionnement de double filaments FtsZ-FtsA composés d'un filament de FtsZ (en vert) et d'un filament de FtsA (en rouge), sous l'arche formée par l'homodimère d'EzrA (en bleu), ancré dans la membrane cytoplasmique par les hélices N-terminales. D'après Cleverley et al., 2014.

Relation entre la division et la ségrégation du chromosome

La réplication du chromosome a lieu au tout début du cycle cellulaire ; la ségrégation des chromosomes est ensuite concomitante avec la mise en place de l'anneau Z (van Raaphorst et al., 2017). De plus en plus d'études pointent un lien fonctionnel entre la ségrégation des chromosomes et la division. L'interaction entre MatP, ZapA et ZapB évoquée précédemment en est un témoin (Buss et al., 2017).

FtsK par exemple est une protéine membranaire recrutée par FtsZ très tôt dans le cycle cellulaire (Wang and Lutkenhaus). Cette protéine est une pompe à ADN dépendante de l'hydrolyse de l'ATP dont le rôle est la résolution des chromosomes

des cellules filles (Massey et al., 2006; Pease et al., 2005). FtsK est également impliquée dans l'attachement de FtsZ à la membrane, et stabilise le divisome chez *E. coli* (Draper et al., 1998). Il a été proposé que FtsK permette à la cellule de prévenir la fermeture du septum avant que les deux chromosomes n'aient été complètement ségrégués (Dubarry and Barre, 2010).

Dynamique de l'anneau Z

La stabilité de l'anneau Z observé en microscopie de fluorescence conventionnelle n'est qu'une apparence. En effet, il a été montré que seulement 30% des monomères de FtsZ sont présents au sein de l'anneau Z chez *B. subtilis* (Stricker et al., 2002), et 40 à 50% chez *S. pneumoniae* (Jacq et al., 2015). Des expériences de retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) ont par ailleurs montré que la demi-vie de présence des monomères de FtsZ au sein de l'anneau est de 30 secondes chez *B. subtilis*, ce qui est particulièrement fugace au regard de la dynamique macroscopique de l'anneau Z. Nous savons aujourd'hui que l'anneau Z est constitué d'amas protéiques hétérogènes (Jacq et al., 2015; Strauss et al., 2012). Bien que les molécules de FtsZ au sein de l'anneau soient immobiles, il a été montré *in vitro* (Loose and Mitchison, 2014) et très récemment *in vivo*, que les filaments de FtsZ ont un mouvement dit « en tapis roulant », résultant de la capacité de FtsZ à polymériser et dépolymériser, et dépendant donc de son activité GTPase (Fig. 11) (Bisson-Filho et al., 2017; Yang et al., 2017).

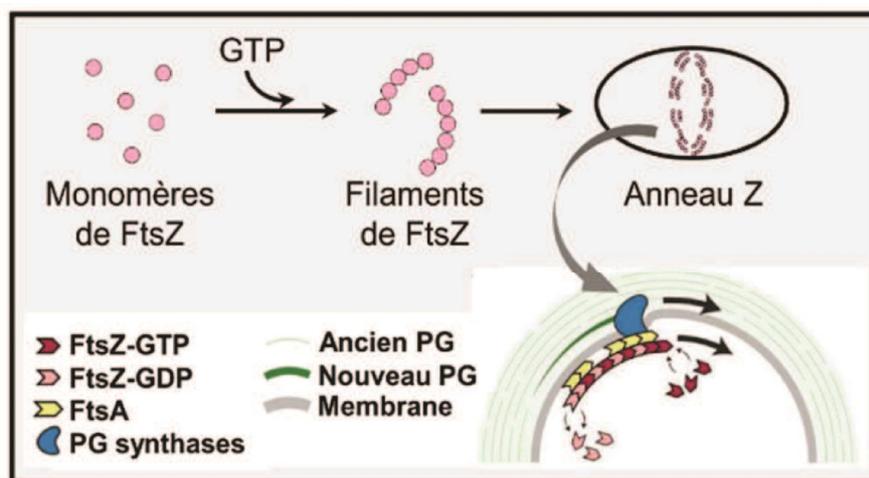


Figure 11 : Polymérisation de FtsZ lors de sa liaison au GTP, formation de l'anneau Z au site de division et modèle du « tapis roulant ». D'après Bisson-Filho et al., 2017.

Cette dynamique des filaments de FtsZ est nécessaire pour la processivité des machineries de synthèse du PG, en d'autres termes pour que la synthèse du septum soit homogène et complète. L'organisation des filaments de FtsZ au sein des amas protéiques et plus généralement au sein de l'anneau n'est pas élucidée. En effet, alors que la plupart des modèles présentent des filaments de FtsZ organisés perpendiculairement à l'axe longitudinal de la bactérie, il a été montré que les filaments de FtsZ au sein de l'anneau présentent une forte anisotropie, différente en fonction des bactéries (Si et al., 2013).

2.3.4.2. Activités de synthèse du PG

D'après le modèle de synthèse du PG couramment admis, le pneumocoque commence par s'allonger en synthétisant du **PG non septal** (appelé **synthèse de PG périphérique** ou **synthèse pré-septale**) grâce au complexe protéique appelé élongasome (Philippe et al., 2015a; Sham et al., 2012). Par la suite, la synthèse de **PG septal** par le divisome va mener à la formation du **septum (cloison de PG orientée perpendiculairement au grand axe de la cellule)** et permettre à la cellule de se diviser. Les protéines impliquées dans l'élongasome ont été déterminées principalement sur la base de la morphologie de souches de délétion ou de déplétion. C'est le cas pour **PBP2b** (bPBP) et la protéine SEDS **RodA**. En effet la déplétion d'une de ces protéines entraîne un raccourcissement des cellules, qui présentent de plus des défauts de séparation des cellules filles (Berg et al., 2013; Straume et al., 2017). Sur le même principe, la délétion ou la troncation de **MreC**, **EloR**, **RodZ**, **MreD** ou **DivIVA** entraîne un raccourcissement des cellules (Stamsås et al.; Straume et al., 2017; Fleurie et al., 2014b). D'autres composants de l'élongasome ont été identifiés grâce à leur interaction fonctionnelle avec une protéine connue de l'élongasome. Par exemple, il a été montré que le complexe formé par **MreC**, **MreD** et la protéine **CozE** est nécessaire à la localisation de **PBP1a** (aPBP) au centre de la cellule, impliquant **PBP1a** et **CozE** dans l'élongasome (Fenton et al., 2016). La transglycosylase lytique **MltG**, fait également partie de l'élongasome. En effet, la souche de délétion de **MltG** contient des mutations suppresseurs inactivant **PBP1a**, et la diminution de l'activité de **MltG** entraîne la perte d'essentialité des protéines

de l'élongasome PBP2b, MreC, MreD, RodZ et RodA (Tsui et al., 2016; Yunck et al., 2016).

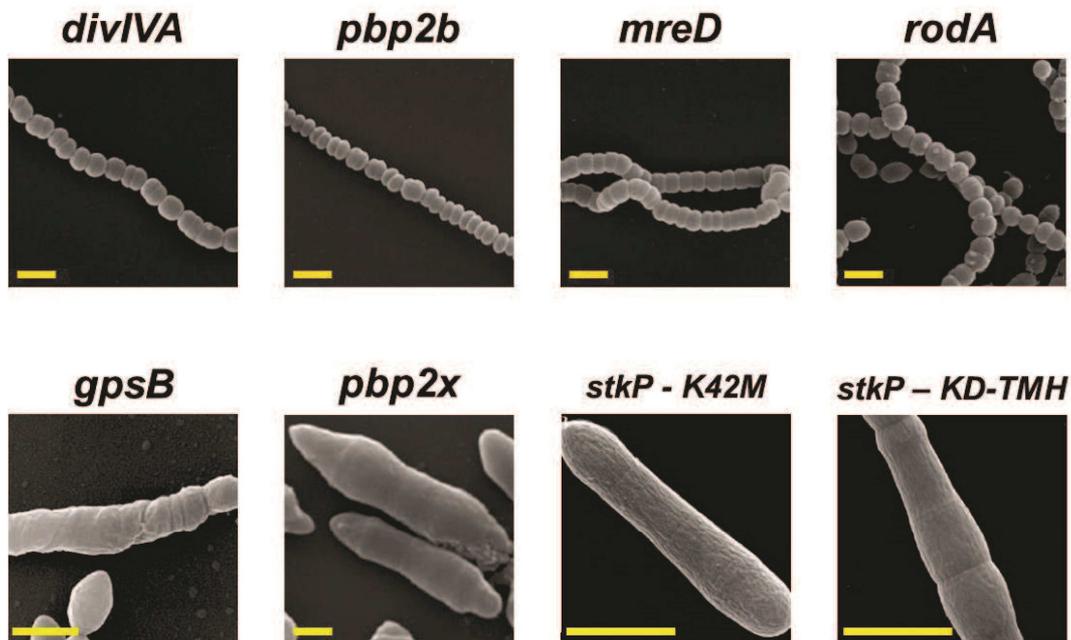


Figure 12 : Morphologie de souches de pneumocoque mutées pour des protéines impliquées dans l'élongasome (haut) ou le divisome (bas). Pour les gènes *divIVA*, *mreD* et *gpsB*, il s'agit de souches de délétion. Pour les gènes *pbp2b*, *rodA* et *pbp2x*, il s'agit de souches de déplétion. *stkP-K42M* correspond au gène muté codant une forme inactive de la kinase StkP. *stkP-KD-TMH* correspond au gène muté codant pour la kinase StkP privée de son domaine extracellulaire. Barres d'échelle : 1 µm. L'image de la souche *gpsB* est adaptée de Fleurie et al., 2014b. L'image de la souche *pbp2x* est adaptée de Berg et al., 2013. Les images des souches *stkP-K42M* et *stkP-KD-TMH* sont adaptées de Fleurie et al., 2012. Les images des souches *divIVA*, *pbp2b*, *mreD* et *rodA* sont adaptées de Straume et al., 2017.

Les protéines du divisome ont également été déterminées à partir de la morphologie des souches mutées pour ces protéines. Par exemple, la délétion du gène codant la protéine GpsB, un paralogue de DivIVA, entraîne la formation de cellules allongées avec des septa non finis (Fleurie et al., 2014b). C'est le cas également pour PBP2x et FtsW, les deux protéines majeures de la synthèse du PG septal (Berg et al., 2013; Boyle et al.; Philippe et al., 2015a).

Certaines protéines sont quant à elles impliquées à la fois dans l'élongasome et dans le divisome. C'est le cas de FtsZ comme évoqué précédemment, mais également de StkP, la seule Ser/Thr kinase connue chez le pneumocoque (Nováková et al., 2005). StkP est une protéine bitopique dont la partie C-terminale à l'extérieur

de la cellule contient 4 domaines PASTA qui interagissent avec le PG (Maestro et al., 2011). Il a très récemment été montré que les trois domaines PASTA les plus proches de la membrane sont interchangeables, permettent l'activation de StkP indépendamment de sa liaison au PG, et contrôlent l'épaisseur du septum. Le domaine PASTA distal quant à lui localise StkP au site de division et permet la séparation finale des deux cellules filles grâce à un motif de liaison à l'hydrolase du PG LytB (Zucchini et al., 2018). Il a également été montré que le domaine extracellulaire de StkP interagit avec PBP2x et que cette interaction est essentielle à la localisation septale de PBP2x (Morlot et al., 2013).

Le domaine cytoplasmique de StkP quant à lui contient le domaine kinase. En absence de StkP ou de son domaine kinase, les cellules présentent une morphologie arrondie, des défauts d'orientation du septum, et forment des chainettes (Fig. 12). De manière intéressante, la souche possédant le gène muté *stkP-K42M*, codant une version inactive de la kinase, présente une morphologie tout à fait différente : la majorité des cellules sont radicalement allongées et possèdent plusieurs septa avortés. Cela indique que la présence du domaine kinase inactif inhibe la septation. L'hypothèse proposée est que le domaine kinase interagit physiquement avec les partenaires de StkP et que son activité kinase régule ces interactions. Une version inactive de StkP séquestrerait donc ses partenaires, entraînant des défauts de division, alors qu'une version délétée du domaine kinase ne séquestrerait pas les partenaires, affectant peu la division (Fleurie et al., 2012).

DivIVA et GpsB sont deux protéines paralogues interagissant avec StkP. DivIVA semble faire partie à la fois de l'élongasome et du divisome car sa souche de délétion a un phénotype en chaînes de cellules arrondies présentant des septas avortés (Fig. 12). GpsB quant à elle semble faire partie du divisome, car en son absence les cellules ne sont plus capables de former des septa complets. D'après le modèle proposé, DivIVA favoriserait dans un premier temps l'élongation à travers l'activation de la synthèse périphérique de PG par PBP2b et RodA. Ensuite, GpsB recruterait StkP au site division où elle phosphorylerait DivIVA, ce qui activerait la division (synthèse de PG septal) et inhiberait la synthèse périphérique (Fleurie et al., 2014b).

Nous avons vu que les deux bPBPs et les deux SEDS connues chez le pneumocoque sont essentielles et collaborent pour effectuer la synthèse de PG périphérique (PBP2b et RodA) ou septale (PBP2x et FtxW) de PG. Les trois aPBPs

quant à elles sont individuellement dispensables et semblent être impliquées dans les deux modes de synthèse du PG. Une protéine membranaire intégrale appelée **MacP** interagit avec PBP2a et semble nécessaire à son bon fonctionnement. Il a également été montré que MacP est phosphorylée par StkP, et que sa phosphorylation est nécessaire pour son action sur PBP2a, indépendamment de leur interaction (Fenton et al., 2018).

Contrairement aux enzymes de synthèse du PG, très peu de choses sont connues sur le rôle des hydrolases dans la synthèse du PG. En particulier, l'identité même de la ou les enzymes responsables de l'incorporation du nouveau PG à l'ancien réseau est à l'heure actuelle inconnue. Alors que LytB semble impliquée dans la séparation finale des cellules filles et Pmp23 dans la correction des erreurs de synthèse du PG, MltG et PcsB semblent être impliquées respectivement dans la synthèse périphérique et la partition du septum.

3. Microscopie optique et super-résolution

3.1. La microscopie optique

L'invention du premier microscope remonte probablement au début du XVII^{ème} siècle. A cette époque, les microscopes les plus utilisés étaient basés sur l'utilisation d'une seule lentille à fort grossissement. Un autre modèle de microscope, appelé microscope composé, avait été créé par Robert Hooke. Ce microscope combinait plusieurs lentilles afin de combiner leur pouvoir grossissant. Les lentilles à cette époque causaient de lourdes aberrations chromatiques qui étaient donc cumulées dans ce microscope, délivrant une image de moins bonne qualité que le microscope à une seule lentille et rendant le microscope multi-lentille peu populaire bien qu'avant-gardiste. De nombreux progrès ont été accomplis dans la correction de ces aberrations chromatiques, et le microscope composé fini par s'imposer à tous à la fin du XVIII^{ème} siècle.

Un microscope optique classique dit « en champ clair » est constitué de plusieurs éléments disposés entre la source de lumière et l'œil de l'observateur. La lumière blanche issue de la **source de lumière** traverse tout d'abord l'**échantillon** déposé sur une **platine**. La lumière ainsi modifiée et porteuse de l'image de l'échantillon est captée par l'**objectif** qui est un ensemble de lentilles permettant le grossissement de l'image de l'échantillon. Par la suite, cette lumière modifiée par l'objectif arrive à l'**oculaire**, qui est composé également de lentilles, dont le rôle principal est de rendre les rayons de l'image parallèles, ce qui permet une observation agréable pour l'observateur. Un système d'ajustement de la distance entre l'ensemble objectif-oculaire et la platine, appelé **mise au point**, permet de disposer le plan focal au niveau de l'échantillon à observer. Une variante est le microscope « en réflexion », dans lequel la lumière provient du dessus de l'échantillon et est non pas transmise mais réfléchi par ce dernier. Il est mieux adapté pour des échantillons épais, jusqu'à plusieurs centimètres, et donne des informations sur la surface de l'objet, contrairement au microscope à transmission

mieux adapté aux objets très fin ou transparents, donnant des informations sur l'intérieur de l'échantillon. Bien que rapide à mettre en place et ne nécessitant que peu de préparation de l'échantillon, la microscopie en champ clair produit une image peu contrastée des objets biologiques, et dont la résolution est limitée à 250 nm dans le meilleur des cas.

3.2. La microscopie de fluorescence

Pour remédier aux limitations de la microscopie en champ clair, la microscopie de fluorescence utilise des protéines fluorescentes ou des fluorophores inorganiques afin d'observer des protéines ou des structures d'intérêt au sein d'un échantillon biologique. Le contraste apporté par cette méthode est de loin bien plus élevé que la microscopie en champ clair puisque ce n'est pas la lumière traversant l'objet qui est observée, mais la fluorescence émise par le fluorophore couplé à la molécule d'intérêt.

La fluorescence est un phénomène physique qui peut être facilement expliqué par le diagramme de Jablonski (Fig. 13)

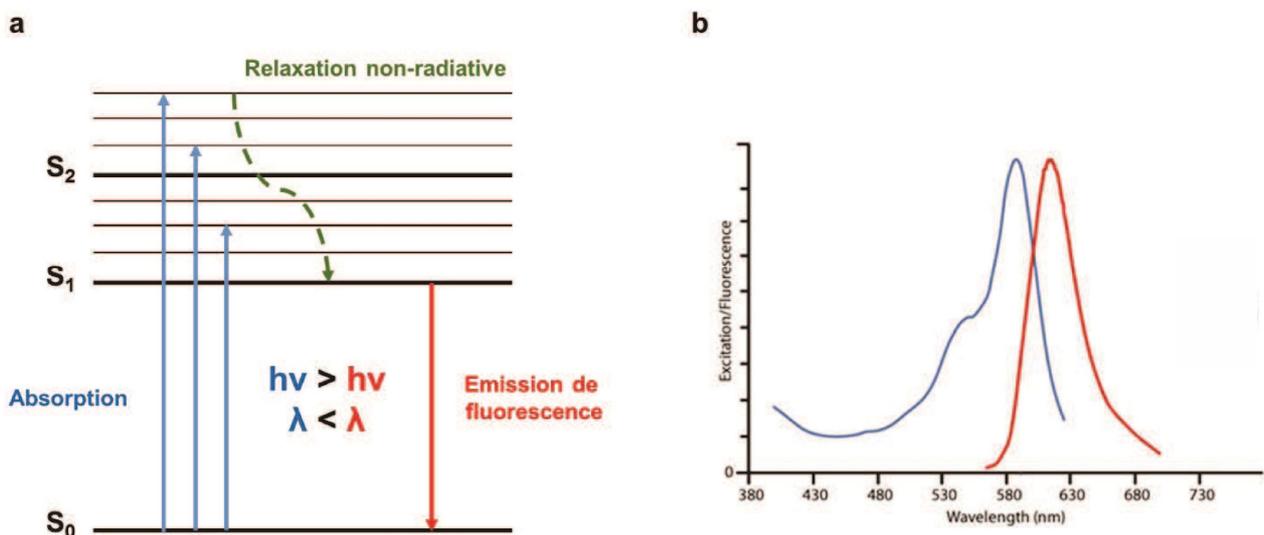


Figure 13 : Principe de la fluorescence. (a) Le Diagramme de Jablonski représente les différents niveaux d'énergie d'une molécule et leurs transitions. Ici, un fluorophore est excité par une radiation lumineuse d'énergie strictement supérieure à la transition entre les états S₀ et S₁. Après une relaxation non-radiative, sous forme de vibration ou de chaleur, la molécule retrouve son état énergétique d'origine par l'émission d'un photon d'énergie $h\nu$ strictement inférieure à l'énergie du photon absorbé. (b) Spectres d'absorption (bleu) et d'émission (rouge) de l'AlexaFluor 647 (source : Jackson Immuno Research). L'énergie du photon émis par le fluorophore étant strictement inférieure à celle du photon absorbé, la longueur d'onde de la lumière émise sera plus grande que celle absorbée, c'est le principe du décalage de Stokes.

3.3. La limite de résolution en microscopie optique

Le caractère ondulatoire de la lumière implique qu'elle est soumise au phénomène de diffraction. La diffraction de la lumière aura entre autres conséquences qu'un point lumineux ne sera pas visible comme un point mais comme une tache, appelée la tache d'Airy ou **PSF** (pour **P**oint **s**pread **f**unction, fonction d'étalement du point en anglais). Cette propriété de la lumière est un élément essentiel de la microscopie optique car elle est responsable de la limite de résolution autour de 250 nm. En effet, **la résolution d'un microscope est la distance minimale en dessous de laquelle deux points ne peuvent plus être distingués l'un par rapport à l'autre**. D'après le critère de Rayleigh, il s'agit de la distance R qu'il y a entre le maximum du premier signal, et le premier minima du second signal. La distance de Rayleigh R peut-être exprimée en fonction de la longueur d'onde λ utilisée et de l'ouverture numérique de l'objectif NA qui est reliée aux dimensions du cône de lumière parvenant à l'objectif et à l'indice de réfraction du milieu.

$$R = \frac{0,61 * \lambda}{NA}$$

Pour diminuer la limite de résolution il est donc possible d'optimiser ces deux variables :

1- En diminuant la longueur d'onde utilisée, bien que l'utilisation du spectre visible ne permette pas de descendre en dessous de 400 nm. Il est possible d'utiliser d'autres sources de rayonnement, comme les électrons qui ont une longueur d'onde 100 000 fois plus petite que les photons du spectre visible, utilisés dans la microscopie électronique.

2- En augmentant l'ouverture numérique. Pour cela, il faut que l'indice de réfraction du milieu soit la plus haute possible. L'indice de réfraction de l'air est approximativement de 1 alors que celui du verre est d'environ de 1.5. L'utilisation d'un objectif à immersion dans une huile dont l'indice de réfraction est proche du verre permet donc de diminuer la limite de résolution.

Ces astuces optiques permettent de diminuer légèrement la limite de résolution, mais sans descendre en dessous des 250 nm. C'est pourquoi de nouvelles techniques de microscopie optique ont vu le jour afin de dépasser cette limite.

3.4. Les microscopies à super-résolution

3.4.1. La microscopie par illumination structurée (SIM)

La microscopie par illumination structurée (SIM) consiste à utiliser une illumination structurée des échantillons qui, en se superposant à la structure propre de l'échantillon, provoque l'apparition des franges de moiré. Les franges de moiré ont la propriété d'avoir une fréquence spatiale plus basse que les structures de l'échantillon, ce qui permet à l'objectif de les capter. Après plusieurs prises d'image et une reconstruction informatique, la limite de résolution latérale peut être diminuée à 100 nm. Cette technique est très employée par les biologistes car elle fonctionne avec des fluorophores couramment utilisés en microscopie optique conventionnelle.

3.4.2. Déplétion par émission stimulée (STED)

La microscopie de déplétion par émission stimulée est basée comme son nom l'indique sur le principe d'émission stimulée. Contrairement à l'émission spontanée de lumière par un fluorophore excité (Fig. 13), il est possible de stimuler l'émission de lumière par ce fluorophore en utilisant un rayon lumineux incident de même énergie. Un microscope STED est basé sur un microscope confocal à balayage dans lequel un laser est ajouté qui a une longueur d'onde permettant l'émission stimulée des fluorophores et une forme de tore. Les fluorophores atteints par ce laser seront donc désexcités, ce qui permettra d'observer uniquement la fluorescence des fluorophores présents dans un espace restreint.

3.4.3. Les microscopies de localisation de molécules uniques

Les microscopies de localisation de molécules uniques (SMLM ou Single molécule localization microscopy) se basent sur une stratégie qui consiste à n'observer qu'un seul fluorophore à la fois. Ainsi, il est possible de déterminer avec précision le centre de la PSF, c'est-à-dire de localiser le fluorophore. Pour exciter la fluorescence de molécules uniques, on va avoir recours à l'activation/excitation stochastique des fluorophores présents dans l'échantillon biologique. Un cycle d'acquisition d'images en SMLM consiste donc à activer/exciter quelques molécules fluorescentes dans le champ de microscopie, enregistrer leur image, puis les éteindre. Ce cycle est répété un très grand nombre de fois afin d'imager toutes les molécules de l'échantillon. Par la suite, un traitement informatique permet de localiser le centre de chacune des molécules fluorescentes et reconstituer l'image finale qui est la somme de toutes les localisations. En théorie la résolution de cette méthode d'imagerie pourrait atteindre la taille des fluorophores (quelques nanomètres), mais la précision de localisation du fluorophore étant dépendante du nombre de photons détectés, la résolution des images issues de SMLM est le plus souvent autour des 20 nm. Il existe de nombreuses méthodes de SMLM, avec différentes manières d'activer les fluorophores de l'échantillon. Je vais présenter ici deux des techniques les plus utilisées, le PALM et le dSTORM.

Microscopie par localisation photo-activée (PALM)

La microscopie par localisation photo-activée (PALM ou photo-activated localization microscopy) est une technique de SMLM basée sur l'utilisation de protéines fluorescentes photo-transformables (Betzig et al., 2006). Il existe trois principaux types de protéines fluorescentes photo-transformables (Adam, 2014; Shcherbakova et al., 2014):

- 1- Les **protéines fluorescentes photo-convertibles**, comme Dendra2 ou mEos2, sont constitutivement fluorescentes et ont la capacité de changer de longueur d'onde d'émission après avoir été irradiées par des ultraviolets (UV). Cette

modification est irréversible et provient du clivage d'une liaison peptidique qui modifie ainsi la conformation de la protéine.

2- Les **protéines fluorescentes photo-activables** comme PAmCherry ou PAmKate ne sont pas constitutivement fluorescentes, mais le deviennent après avoir été illuminées par des UV. Dans la plupart des cas, cela provient de la décarboxylation d'un résidu glutamate à proximité du chromophore. A la suite de cela, le chromophore préalablement neutre devient anionique, qui est sa forme excitable. Cette transformation est également irréversible.

3- Les **protéines fluorescentes photo-commutables** comme Dronpa ou mGeosM ont la capacité de passer de l'état non-excitable à excitable après avoir été irradiées par des UV. La différence avec les protéines photo-activables réside dans le fait que les protéines photo-commutables ont la capacité de revenir à un état non-excitable. En effet, la transformation n'implique pas ici de réaction chimique, mais un changement de conformation du chromophore.

Pour effectuer une étude en PALM, il faut exprimer dans la bactérie une protéine fluorescente photo-transformable fusionnée avec la protéine d'intérêt. Après culture dans un milieu défini, les cellules sont lavées, éventuellement fixées, et enfin déposées entre lame et lamelle. Toutes les étapes jusqu'à la prise d'images doivent être effectuées dans un environnement le plus sombre possible afin de prévenir toute photo-transformation des protéines fluorescentes. Pour la collecte de données PALM, deux lasers doivent être utilisés : le premier sera un laser UV utilisé à faible puissance afin de photo-transformer les protéines fluorescentes de façon stochastique (pour avoir très peu de protéines photo-transformées à chaque prise d'image), le second sera un laser dont la longueur d'onde est au plus proche du maximum du spectre d'absorption de la protéine fluorescente. Ces deux lasers peuvent être utilisés en continu, ou séquentiellement selon la stratégie décidée par l'expérimentateur. La puissance du laser d'excitation reste identique tout au long de la prise d'images, mais la puissance du laser UV augmentera durant la prise de vue afin de contrebalancer la diminution de la quantité de fluorophores activables. Plusieurs milliers d'images sont collectées (temps d'intégration d'une dizaine de millisecondes) afin d'imager toutes les protéines fluorescentes dans le champ de

microscopie ; la durée de collecte totale peut excéder 15 min. L'image finale est reconstituée par traitement informatique grâce au principe évoqué précédemment.

Microscopie directe de reconstruction optique stochastique (dSTORM)

La microscopie directe de reconstruction optique stochastique (dSTORM ou **direct Stochastic optical reconstruction microscopy**) est une autre technique de SMLM (Heilemann et al., 2008; van de Linde et al., 2011). Elle est basée sur le scintillement de fluorophores organiques couramment utilisés en microscopie de fluorescence conventionnelle comme les cyanines **Alexa Fluor 647 (AF647)** ou Cy3B, ou les rhodamines Alexa Fluor 488 ou Atto 520 (Dempsey et al., 2011). Le principe de base est la réduction stable et réversible de ces fluorophores afin de provoquer un phénomène de scintillement de leur fluorescence (Fig. 14). Pour cela, l'échantillon est placé dans un tampon contenant un système enzymatique consommant l'oxygène du milieu, ainsi qu'un agent réducteur (souvent la mercaptoéthanolamine (MEA) ou le β -mercaptoéthanol (BME)). Une fois les fluorophores éteints par irradiation avec une forte puissance de laser d'excitation (l'irradiation en condition réductrice va entraîner l'addition d'un groupement thiol sur le fluorophore et éteindre sa fluorescence), ils vont aléatoirement retrouver leur état d'origine (état oxydé) de façon spontanée et/ou par irradiation aux UV. Le protocole d'acquisition d'images est très similaire à celui du PALM décrit dans le paragraphe précédent. Une fois imagé, le fluorophore sera soit photoblanchi, soit de nouveau éteint réversiblement. Une des différences majeures avec le PALM est donc l'impossibilité d'effectuer de quantification absolue puisque l'on ne peut pas savoir si un même fluorophore a scintillé une ou plusieurs fois.

Les fluorophores organiques peuvent être associés à la molécule à imager de différentes manières. Il est possible de coupler le fluorophore à un anticorps (primaire ou secondaire) ciblant une protéine d'intérêt, il est possible également d'utiliser un fluorophore comportant un groupement réactif ciblant un composé que l'on aura préalablement incorporé dans la cellule (desthiobiotine/streptavidine, ou encore cycloaddition azide-alkyne par exemple (voir chapitre 3.2.1 de la section *Résultats*)).

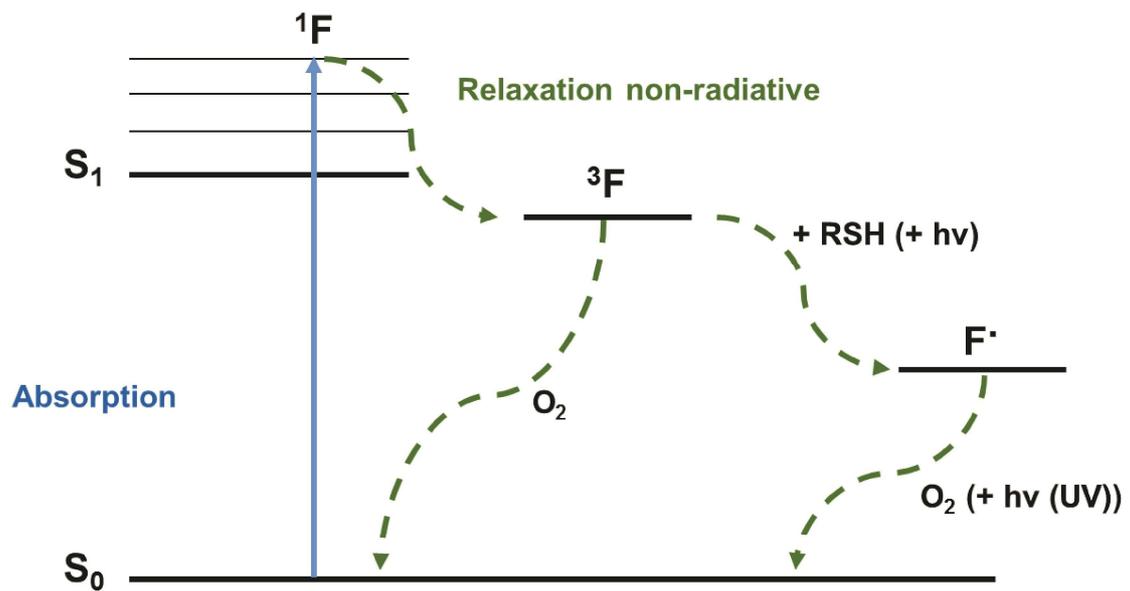


Figure 14 : Principe physique du dSTORM. Sur ce diagramme de Jablonski, un fluorophore, tel que l'AF647 par exemple, est excitable dans son état fondamental singulet (S_0). Après avoir été excité par absorption d'un photon, il est dans son état singulet excité ($1F$). Il peut se désexciter soit par fluorescence (voir Fig. 13), soit par relaxation non-radiative en passant par un état instable appelé triplet ($3F$). La molécule dans son état triplet peut réagir avec l'oxygène du milieu pour revenir à son état singulet fondamental, ou, en réagissant avec un agent réducteur du milieu (RSH) peut former un radical anion (F^\bullet) stable. Le fluorophore sous cette forme peut enfin être oxydé par l'oxygène du milieu pour retourner à l'état fondamental singulet, c'est-à-dire être de nouveau excitable.

3.5. Exemple d'utilisation de la microscopie en biologie : le marquage de la synthèse du peptidoglycane

Les premières observations de paroi bactérienne ont été faites par microscopie électronique. Le PG étant peu dense aux électrons, il a fallu mettre en place des techniques afin de le détecter. La première stratégie a été de marquer les amines libres à la surface des bactéries par un atome lourd, dense aux électrons. Cela a permis d'observer des parois bactériennes isolées (sacculi) en microscopie électronique, et de prouver que la paroi confère leur forme aux bactéries (Formanek and Formanek, 1970). L'inconvénient de cette technique est qu'elle n'est pas spécifique au PG néo-synthétisé, mais marque toute la paroi.

Pour y remédier, la solution a été d'utiliser la D-cystéine qui n'est normalement pas utilisée par les bactéries. Cet acide aminé est incorporé à la paroi par les machineries de biosynthèse du PG, par remplacement de la D-Ala terminale du pentapeptide du PG (Caparrós et al., 1992a, 1992b). Par la suite, un anticorps capable de reconnaître la D-cystéine est utilisé pour effectuer un immuno-marquage. L'observation est réalisée en microscopie électronique si l'anticorps est couplé à des billes d'or ou en microscopie optique de fluorescence si ce dernier est couplé à un fluorophore (de Pedro et al., 1997).

Développée au début des années 80, la cryo microscopie électronique (cryo-EM) a permis une meilleure conservation des structures biologiques en les vitrifiant par congélation ultra-rapide. Cette méthode a permis l'observation du PG des bactéries *E. coli* et *P. aeruginosa* avec une qualité exceptionnelle (Matias et al., 2003). En effet, les deux membranes et la couche de PG périplasmique de ces bactéries ont pu être clairement distinguées. Afin de pouvoir étudier la synthèse du PG et les différentes protéines impliquées, il était nécessaire de pouvoir observer sa synthèse par microscopie optique de fluorescence.

Cela fut fait tout d'abord par l'utilisation d'antibiotiques couplés à des fluorophores. Ainsi, la vancomycine qui reconnaît le dipeptide D-Ala-D-Ala de la chaîne pentapeptidique du PG, permet le marquage spécifique de la zone de

synthèse puisque le PG mature possède peu de chaînes pentapeptidiques (Daniel and Errington, 2003; Perkins and Nieto, 1974). Les molécules dérivées des antibiotiques doivent être utilisées avec grande précaution afin de ne pas affecter la physiologie des bactéries observées car leur rôle premier d'inhiber la croissance des bactéries.

En se basant sur les anciens travaux concernant les échanges d'acides aminés au sein du PG, les équipes de Michael VanNieuwenhze et Yves Brun de l'Université de l'Indiana ont développé des molécules fluorescentes dérivées de la D-Ala (les **FDAAs** ou **Fluorescent D-amino acids**) (Kuru et al., 2012, 2015). Ces molécules ont permis de marquer les zones de synthèse de PG dans un grand nombre de bactéries telles que *E. coli*, *B. subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *S. aureus*, *C. crescentus*, ou encore *S. pneumoniae*. Chez certaines bactéries Gram - comme *E. coli* ou *A. tumefaciens*, les **simples D-amino acides (D-Ala)** sont échangés avec le 4^{ème} acide aminé du peptide du PG (une D-Ala), alors que chez *B. subtilis*, une bactérie Gram +, ils sont échangés avec le 5^{ème} acide aminé (une D-Ala également). Le mécanisme proposé pour les bactéries Gram + est l'échange entre le FDAA et la D-Ala distale des pentapeptides par l'activité transpeptidases des PBPs (Fig. 15b) (Kuru et al., 2012). Il a également été proposé que les simples D-amino acides pourraient être incorporés par la voie de biosynthèse du lipide II mais cette hypothèse reste controversée (Morales Angeles et al., 2017). Pour les bactéries Gram -, l'hypothèse est que le 5^{ème} acide aminé soit enlevé par une D,D-carboxipeptidase, puis que les L,D-transpeptidases remplacent le 4^{ème} acide aminé par le FDAA (Fig. 15c) (Kuru et al., 2012). Une deuxième stratégie de marquage basée sur l'utilisation de **dipeptides D-Ala-D-Ala** a été développée en parallèle. Les dipeptides sont incorporés au lipide II par sa voie de biosynthèse, lui-même incorporé au PG naissant par l'activité GT des protéines SEDS et des PBPs (Fig. 15d) (Liechti et al., 2014).

Les FDAAs ont permis des avancées majeures en microbiologie, comme par exemple la découverte du PG chez certaines espèces de *Chlamydia* (Liechti et al., 2014; Pilhofer et al., 2013), ou encore le rôle de la dynamique des filaments de FtsZ dans la synthèse du PG (Bisson-Filho et al., 2017; Yang et al., 2017). Cependant, l'observation des FDAAs est actuellement limitée à la microscopie optique conventionnelle ou au SIM, ce qui limite la résolution des images obtenues à 100 nm, soit seulement un dixième de la taille d'une bactérie.

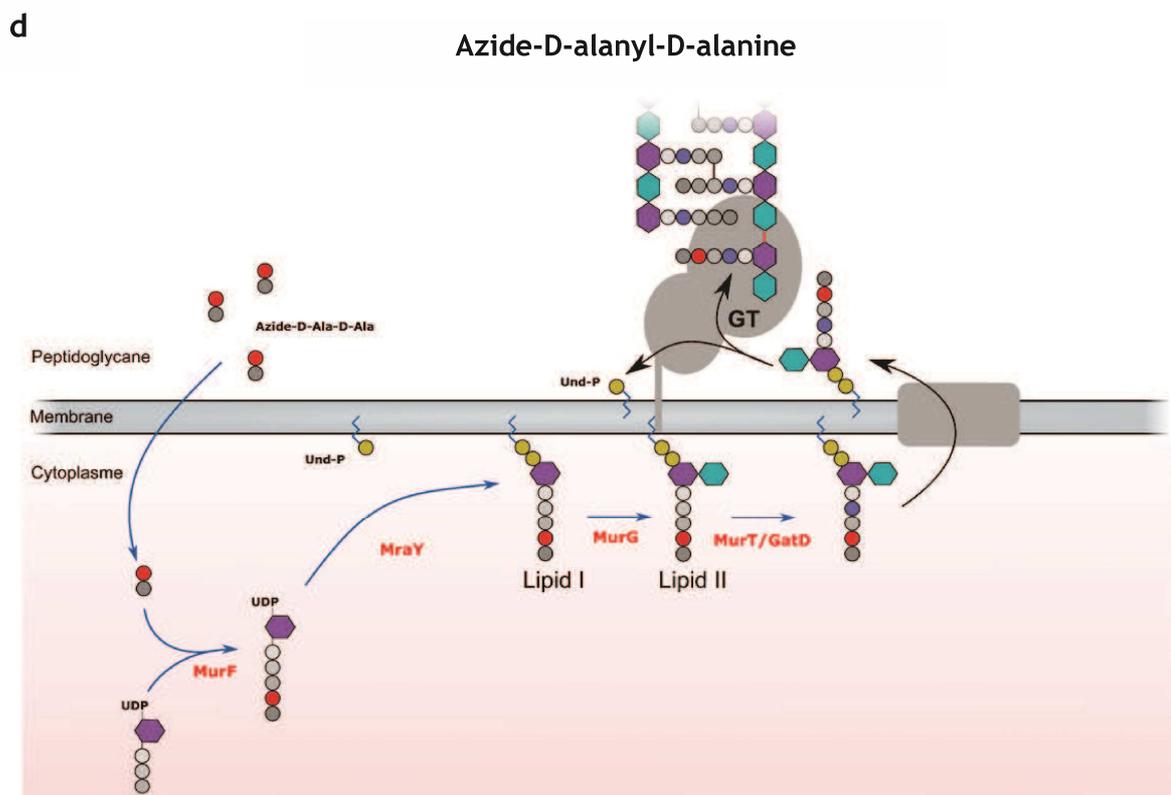
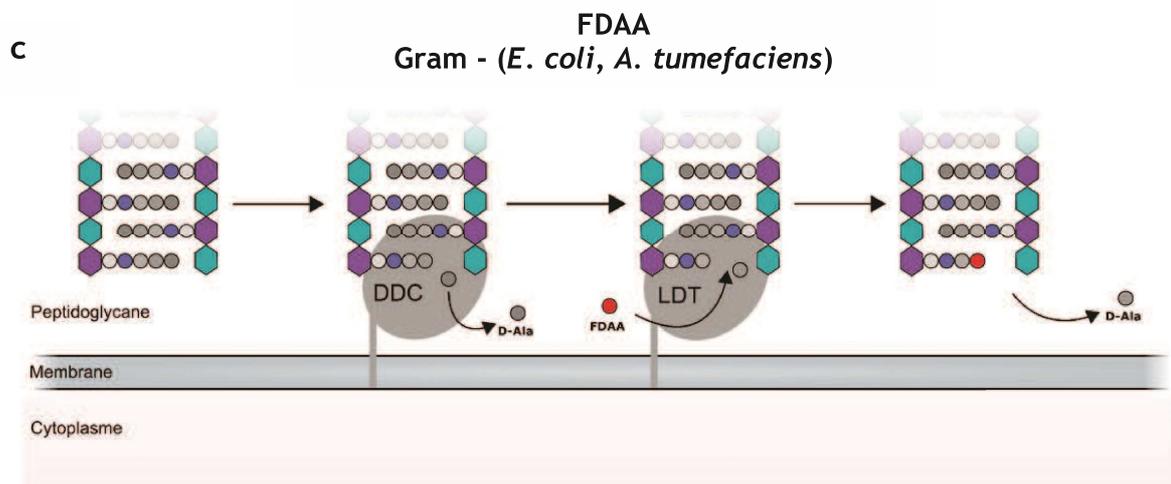
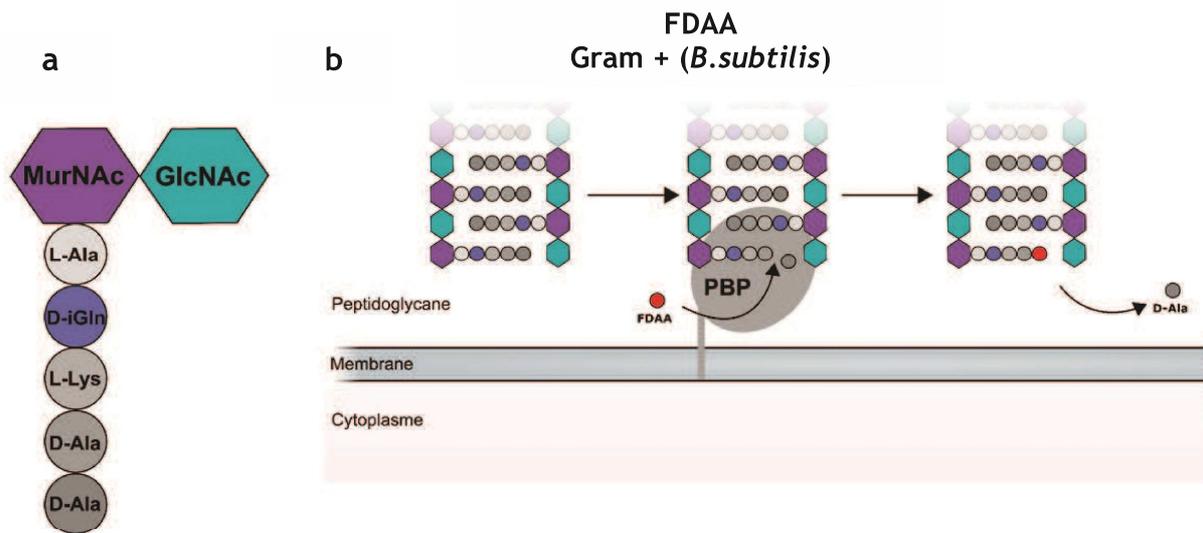


Figure 15 : Le marquage par les FDAA peut être effectué à travers plusieurs mécanismes. (a) Rappel de la composition d'un mucopeptide chez *S. pneumoniae*. (b) Mécanisme proposé pour l'incorporation des FDAA dans les bactéries à Gram positif. (c) Mécanisme proposé pour l'incorporation des FDAA dans les bactéries à Gram négatif. (d) Mécanisme proposé pour l'incorporation des dipeptides D-alanyl-D-alanine. Le schéma présenté ici montre l'incorporation de la molécule azide-D-alanyl-D-alanine dans le PG. Pour l'incorporation du dipeptide D-alanyl-D-alanine-azide la seule différence est la position du résidu azide (boule rouge ans le schéma) au sein du dipeptide, ce qui aura pour conséquence le marquage du 5^{ème} acide aminé au lieu du 4^{ème}.

Résultats

1. Contexte et objectifs de ma thèse

L'objectif de ma thèse était de mieux comprendre comment les machineries morphogénétiques s'assemblent dans la cellule et synthétisent le PG chez le pneumocoque. La microscopie de fluorescence est une méthode de choix pour étudier de tels mécanismes biologiques *in vivo* mais utilisée de façon conventionnelle, sa résolution est limitée à environ 250 nm à cause de la diffraction de la lumière. Cette échelle avoisine le quart de la longueur d'une cellule de pneumocoque (environ 1 μm) et par ailleurs, la grande majorité des protéines morphogénétiques s'assemblent dans une région très restreinte de la cellule qui est la région équatoriale. Enfin, une étude de l'architecture de l'anneau Z en microscopie de localisation de molécules uniques réalisée récemment dans le groupe a montré que l'épaisseur axiale de l'anneau est comprise entre 95 et 127 nm (Jacq et al., 2015). La stratégie expérimentale choisie pour réaliser mes objectifs de thèse a donc logiquement été la microscopie de localisation de molécules uniques, qui inclue les méthodes de PALM et de dSTORM (voir paragraphe 3.4.3 de l'introduction), et permet d'atteindre des résolutions spatiales de 20 à 40 nm (Betzig et al., 2006; Heilemann et al., 2008; van de Linde et al., 2011).

L'idée d'un marquage de la synthèse du PG pour imagerie en dSTORM est née au cours de ma thèse. Le développement de cette méthode nécessitait des compétences en microbiologie, maîtrisées par notre groupe, des compétences en dSTORM, apportées par nos collaborateurs au sein de l'IBS (équipe PIXEL dirigée par Dominique Bourgeois), et des compétences en chimie de synthèse, absentes au sein de l'IBS. Pour développer cette méthode, nous avons donc d'abord contacté les laboratoires américains qui ont développé les FDAAs pour collaborer avec eux sur les aspects de synthèse chimique, mais pour des raisons de conflit d'intérêt potentiel, ils n'ont pu accepter notre proposition de collaboration.

Au cours de ma 1^{ère} année de thèse j'ai donc travaillé sur l'assemblage des machineries morphogénétiques. La stratégie expérimentale consistait à développer la microscopie de localisation de molécules uniques en 2 couleurs chez le

pneumocoque. L'objectif était de **visualiser au sein d'une même cellule la localisation de FtsZ et d'un de ses partenaires**, en particulier EzrA, afin de comprendre comment l'anneau Z échafaude la machinerie de synthèse du PG. Ces travaux, qui ont été réalisés en collaboration avec les biophysiciens de l'équipe PIXEL de l'IBS (pour un support sur les aspects photophysiques du projet) sont détaillés dans le paragraphe 2 de la section *Résultats*.

Au milieu de ma 2^{ème} année de thèse, nous avons eu l'opportunité de discuter avec un chimiste de l'Université Grenoble Alpes, Yung-Sing Wong, qui travaille sur la recherche de molécules ciblant les acides nucléiques, les transporteurs ABC ou les membranes biologiques. Au cours de nos discussions, il est apparu que Y-S Wong possédait toutes les compétences requises pour synthétiser les molécules dont nous avons besoin pour marquer le PG nouvellement synthétisé à l'aide de fluorophores utilisables en dSTORM. Au cours de mes 2^{ème} et 3^{ème} années de thèse, en collaboration avec Y-S Wong et l'équipe PIXEL, j'ai donc **développé des outils permettant de visualiser la synthèse du PG en dSTORM et réalisé cette étude pionnière chez le pneumocoque**. Ces travaux sont détaillés dans le paragraphe 3 de la section *Résultats*.

2. Assemblage des machineries morphogénétiques

2.1 Introduction

La morphogénèse chez les ovocoques (qui incluent les lactocoques, les entérocoques et les streptocoques, tel que *S. pneumoniae*) implique des protéines affectées à l'élongation de la cellule, formant un complexe appelé « l'élongasome », et des protéines affectées à la division de la cellule, formant un complexe appelé « le divisome ». L'existence de ces complexes, l'identité des protéines qui les composent, les activités enzymatiques qu'ils abritent et certaines des interactions qu'ils impliquent sont supportées par des données de génétique, biochimie, biophysique, biologie structurale et imagerie cellulaire. Toutefois, nous ne savons pas encore très bien comment l'assemblage et l'activité de ces complexes sont régulés dans le temps et dans l'espace, et quelles sont les interactions physiques et fonctionnelles entre eux. L'investigation des mécanismes d'assemblage de ces complexes a pendant longtemps été limitée par la résolution de la microscopie optique (environ 250 nm), ce qui correspond à peu près au quart de la largeur d'une cellule de pneumocoque. Ces dernières années, la révolution de la microscopie super-résolue a atteint la microbiologie et a permis de nombreuses avancées dans la compréhension de ces mécanismes. Mon laboratoire d'accueil a fait partie des laboratoires pionniers dans l'utilisation de la microscopie super-résolue chez les bactéries, et le premier à mettre au point son usage chez le pneumocoque. En effet, dès 2012, en collaboration avec l'équipe PIXEL, dirigée par Dominique Bourgeois à l'IBS, un travail de développement du PALM chez le pneumocoque a été effectué. Après de nombreux efforts et le travail de thèse d'un doctorant, Maxime Jacq, le PALM a pu être utilisé avec succès pour étudier le remodelage de l'anneau Z au cours du cycle cellulaire chez le pneumocoque (Jacq et al., 2015). Grâce à ce travail, des données inédites sur la nanostructure de l'anneau Z au cours de la division ont été décrites, une nouvelle sous-structure de l'anneau Z a été découverte (double anneau), et le chemin a été ouvert pour l'étude des autres protéines de la division en microscopie super-résolue. Dans la continuité de ce travail, nous voulions comprendre comment certaines protéines régulent l'assemblage de l'anneau Z et

comment la machinerie de synthèse du PG s'assemble sur ce dernier. Parmi ces protéines, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à EzrA.

Cette protéine est présente chez un grand nombre de bactéries à Gram positif, dont de nombreux pathogènes ciblés par l'OMS comme des menaces majeures pour la santé humaine (*S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *S. pneumoniae*, *Clostridium difficile* et *Enterococcus faecium*). Cette protéine essentielle chez le pneumocoque pourrait donc être une cible intéressante pour la recherche de nouveaux antibiotiques. De plus EzrA, qui est une protéine membranaire dont la région soluble est localisée dans le cytoplasme (Fig. 10 de la section *Introduction*), joue un rôle central et multiple dans la division. Par un mécanisme encore inconnu mais qui repose sur sa capacité à inhiber la polymérisation de FtsZ, EzrA inhibe l'assemblage d'anneaux Z sur des sites autres que le site de division (Levin et al., 1999). Il a également été proposé qu'EzrA stabilise l'anneau Z une fois assemblé au centre de la cellule (Steele et al., 2011). Enfin, EzrA interagit directement avec FtsZ et avec DivIVA et GpsB, elles-mêmes en interaction directe avec les PBPs ; EzrA joue donc un rôle majeur dans la connexion entre l'anneau Z cytoplasmique et les machineries de synthèse du PG qui sont extracellulaires (Claessen et al., 2008; Fleurie et al., 2014; Steele et al., 2011).

Dans le but de mieux comprendre comment EzrA s'assemble sur l'anneau Z et comment elle assure sa connection avec les synthèses du PG, nous avons cherché à adapter une méthode de microscopie super-résolue à 2 couleurs chez le pneumocoque, pour observer dans une même cellule la nanostructure d'EzrA et de FtsZ.

2.2 Résultats et discussion

1. Construction d'une souche de *S. pneumoniae* exprimant la protéine de fusion EzrA-spDendra2

Dans le but d'observer EzrA en PALM, il nous fallait construire une souche de pneumocoque exprimant la protéine EzrA fusionnée à une protéine fluorescente phototransformable. La précédente étude de notre équipe basée sur le PALM avait utilisé la protéine fluorescente photo-convertible spDendra2 (voir chapitre 3.4.3 de la section *Introduction*), dérivée de Dendra2 et optimisée pour une utilisation chez *S. pneumoniae* (Jacq et al., 2015). De plus, dans cette même étude, il avait été montré que l'imagerie PALM chez le pneumocoque était de meilleure qualité lorsque le gène fusionné à *spdendra2* était exprimé au site endogène. Nous avons donc décidé de créer la souche *ezrA::ezrA-spdendra2*. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de biologie moléculaire appelée Janus, permettant de modifier le génome du pneumocoque sans introduire de cassette de résistance dans la région modifiée, limitant ainsi au maximum les effets polaires de la mutation ou de la délétion de gène (Sung et al., 2001). Pour les détails de la construction de la souche, voir la section *Matériel et méthodes*.

2. La fusion EzrA-spDendra2 permet d'observer la nanostructure de l'anneau formé par EzrA en PALM

Les collectes et traitements de données PALM avec la souche portant le gène de fusion *ezrA-spdendra2* ont été effectués dans les mêmes conditions que ceux réalisés avec la souche exprimant le gène de fusion *ftsZ-spdendra2*. La précision de localisation moyenne des protéines fluorescentes imagées est de 28 ± 5 nm, et le nombre moyen de localisations est de 166 ± 62 localisations par cellule. La totalité des cellules exprime la protéine de fusion EzrA-spDendra2, qui présente un profil de localisation annulaire, observé en projection 2D le long de l'axe radial dans la plupart des cellules (Fig. 16a). Cependant, il arrive parfois que certaines cellules prennent une orientation différente. Pour les cellules en question, il est possible d'observer

la structure annulaire de dessus (Fig. 16b). Nous pouvons ici observer que, tout comme FtsZ, l'anneau formé par la protéine EzrA n'est pas homogène, mais présente des amas protéiques hétérogènes. Ces amas sont parfois même séparés par des zones très sombres, suggérant que la structure annulaire formée par EzrA n'est pas continue. Toutefois, ne sachant pas quelle est la proportion de molécules d'EzrA qui ont été imagées, il faut rester prudent quant à l'interprétation de ces zones de faible densité de signal. Elles pourraient constituer des régions dépourvues de molécule d'intérêt, mais peut-être aussi résulter d'une photo-conversion non homogène de spDendra2 au sein du complexe de division. La nanostructure d'EzrA ressemble toutefois à celle de l'anneau Z, ce qui est cohérent avec le fait qu'EzrA interagisse avec FtsZ.

Nous n'avons pas cherché à comparer de façon plus poussée les nanostructures de FtsZ et EzrA observées en PALM simple couleur. En effet, cette analyse aurait manqué de rigueur sachant que les observations de FtsZ et EzrA n'auraient pas été réalisées au sein d'une même cellule. Pour réaliser une étude plus robuste, nous avons décidé de mettre en place la microscopie super-résolue à 2 couleurs, afin d'observer la nanostructure des anneaux formés par FtsZ et EzrA dans une même cellule.

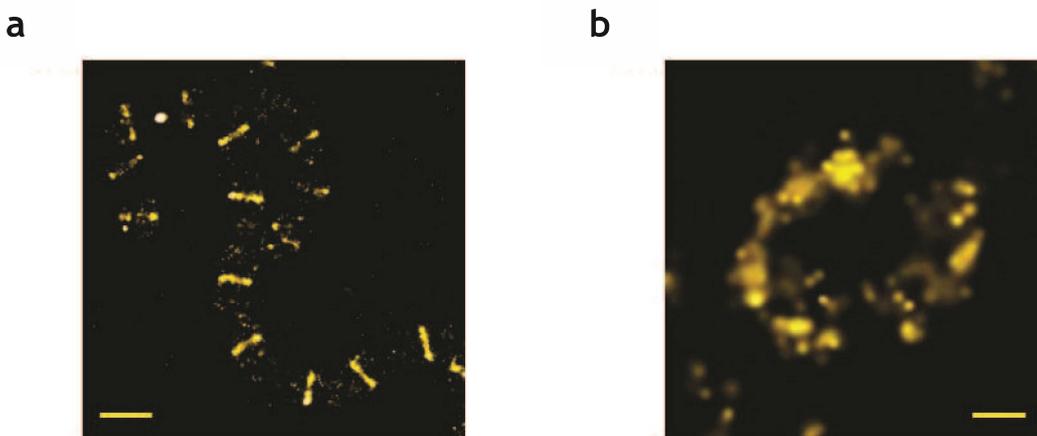


Figure 16 : Microscopie super-résolue PALM des cellules exprimant la fusion endogène EzrA-spDendra2. (a) Champ large en PALM de cellules de pneumocoque exprimant la protéine de fusion endogène EzrA-spDendra2. Barre d'échelle = 1 μ m. (b) Détail du champ de microscopie PALM montrant un anneau formé par EzrA-spDendra2 dans une cellule qui présente un angle d'inclinaison par rapport à l'axe longitudinal. Barre d'échelle = 200 nm.

3. Mise en place de la microscopie super-résolue à 2 couleurs chez *S. pneumoniae*

Il existe plusieurs façons d'observer un échantillon en SMLM à 2 couleurs. Il est possible de combiner les techniques de PALM et de dSTORM de différentes manières, en PALM-PALM, PALM-dSTORM, et dSTORM-dSTORM. Le PALM-PALM consiste à exprimer deux protéines d'intérêt fusionnées chacune à une protéine fluorescente photo-transformable de couleur différente. Le PALM-dSTORM consiste à effectuer un immunomarquage avec un fluorophore utilisable en dSTORM sur des cellules fixées exprimant une protéine fusionnée avec une protéine fluorescente photo-transformable. Enfin, le dSTORM-dSTORM consiste à effectuer deux immunomarcages successifs avec deux fluorophores de couleur différente, utilisables en dSTORM. Chacune des techniques a ses avantages et ses inconvénients, et le choix stratégique doit prendre en compte tous les paramètres, comme la disponibilité d'anticorps ou de nanobodies ciblant la protéine d'intérêt, ou la fonctionnalité de la protéine d'intérêt fusionnée à la protéine photo-transformable. En plus des difficultés inhérentes aux techniques de SMLM simple couleur, l'utilisation d'une deuxième couleur pose de nombreux problèmes photophysiques. En effet, la nature ondulatoire de la lumière suppose que deux signaux lumineux à deux longueurs d'ondes différentes se comporteront de manière différente dans le microscope, ce qui provoquera des aberrations chromatiques latérales et axiales (décalage du signal lumineux et plan focal différent) (Pour une excellente revue sur la résolution des problèmes liés à la SMLM à 2 couleurs voir : Georgieva et al., 2016). Enfin, imager au cours d'une même expérience deux fluorophores, même séquentiellement, implique une gestion parfaite des spectres d'émission et d'excitation des deux fluorophores et nécessite parfois des montages optiques complexes.

Etant donné que nous disposons de la souche exprimant la protéine de fusion FtsZ-spDendra2 au site endogène de *ftsZ* (FtsZ-spDendra2 est la seule copie de FtsZ dans la cellule), la souche exprimant EzrA-spDendra2 au site endogène d'*ezrA* (EzrA-spDendra2 est la seule copie d'EzrA dans la cellule), et d'anticorps contre FtsZ ou EzrA, nous avons choisi la technique du PALM-dSTORM. Avant de pouvoir observer les deux protéines dans une même souche, nous voulions nous assurer que la

nanostructure de FtsZ-spDendra2 imagée en dSTORM à l'aide d'anticorps anti-FtsZ fluorescents (couplés ici à l'Alexa Fluo 647 ou AF647) était similaire à la nanostructure de FtsZ-spDendra2 imagée en PALM dans la même cellule. La fusion FtsZ-spDendra2 étant la seule copie de FtsZ dans la cellule, cette expérience était un contrôle parfait avant d'initier les expériences de co-localisation de FtsZ et EzrA.

Nous avons donc observé la souche exprimant la protéine de fusion FtsZ-spDendra2, après avoir effectué un immunomarquage de FtsZ en utilisant un anticorps primaire de lapin anti-FtsZ, puis un anticorps secondaire ciblant les immunoglobulines de lapin. L'anticorps secondaire était lié à une molécule d'AF647, qui est le fluorophore le plus couramment utilisé en dSTORM. Ces cellules, immergées dans un tampon adéquat pour induire le scintillement de l'AF647, ont été imagées en dSTORM sans illumination UV afin d'éviter de photo-convertir spDendra2, puis imagées en PALM par photoconversion de spDendra2 à l'aide d'un laser UV. Nous avons observé plusieurs bactéries présentant un angle d'inclinaison par rapport à l'axe longitudinal, nous permettant d'observer la nanostructure de l'anneau Z en vue de dessus (Fig. 17).

Nous avons réussi à obtenir des images de l'anneau Z dans les deux couleurs (orangée pour spDendra2 et rouge foncé pour l'AF647). Cependant, nous observons que même si les anneaux se superposent globalement, les amas protéiques observés par l'une ou l'autre des techniques ne se superposent pas. Cette non co-localisation des amas protéiques n'est certainement pas due à la présence de deux versions de FtsZ (FtsZ-spDendra2 et version non fusionnée de FtsZ) car 1) la seule copie de FtsZ dans la souche utilisée est la protéine de fusion FtsZ-spDendra2, et 2) l'analyse du contenu de nos cellules par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-FtsZ n'a pas révélé de clivage protéolytique qui aurait pu libérer du FtsZ non fusionné à spDendra2.

Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat. Tout d'abord, il est possible que la présence de la protéine fluorescente fusionnée à FtsZ cache certains épitopes de FtsZ, limitant sa reconnaissance par les anticorps dans certaines régions. Il est possible également que ce soit la fixation de FtsZ à certains partenaires qui limite la fixation des anticorps. Nous savons également que seulement 20% des molécules de spDendra2 sont imagées dans cette souche (Jacq et al., 2015). Il se pourrait donc

que le sous-échantillonnage des fusions FtsZ-spDendra2, associé au sur-échantillonnage de l'anticorps polyclonal ciblant FtsZ soit responsable des différences observées. Cette expérience contrôle qui montre que FtsZ-spDendra2 ne co-localise pas avec elle-même indique que la méthode PALM/dSTORM ne permet pas d'étudier la co-localisation d'amas protéiques entre FtsZ et un partenaire chez le pneumocoque. Nous ne pouvons donc pas utiliser cette méthode en l'état pour déterminer si les amas protéiques de FtsZ et d'EzrA sont co-localisés. Une des solutions envisagées pour résoudre ce problème est d'utiliser la stratégie du PALM-PALM ou dSTORM/dSTORM en utilisant des fluorophores compatibles.

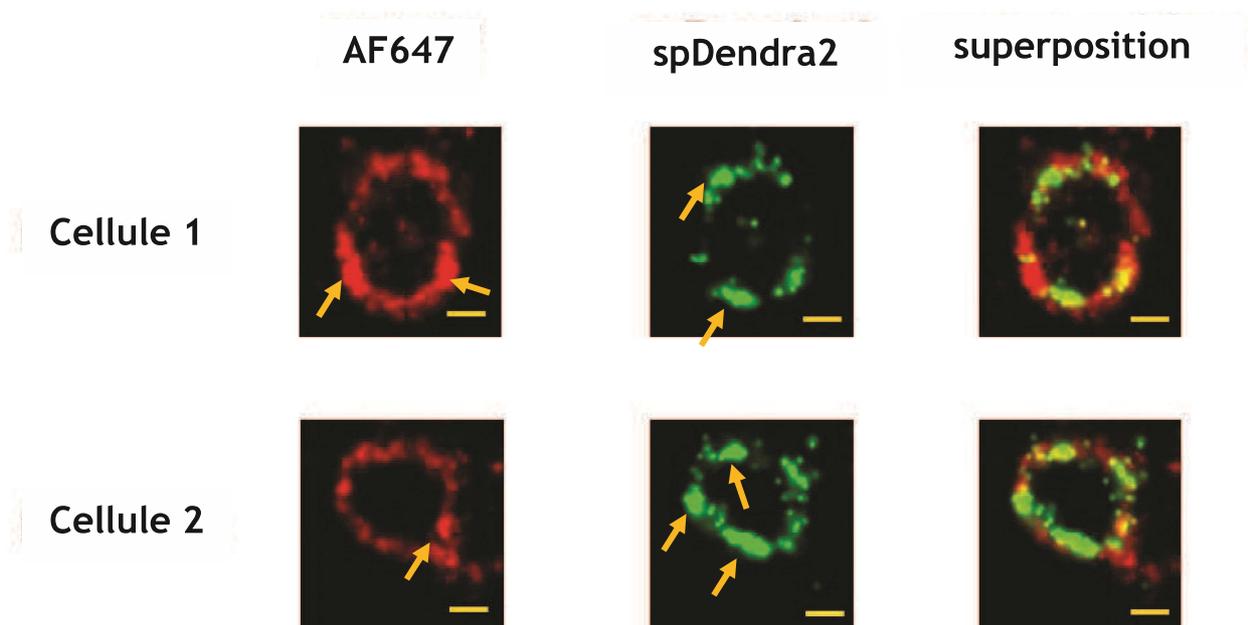


Figure 17 : Imagerie PALM-dSTORM 2-couleurs de l'anneau Z. Détails d'un champ de microscopie PALM-dSTORM représentant deux cellules observées selon un angle d'inclinaison par rapport à l'axe longitudinal. Les flèches oranges pointent les amas protéiques observées dans chacune des images. La souche exprimant la protéine de fusion FtsZ-spDendra2 a été utilisée pour une expérience d'immuno-marquage. Les cellules fixées ont été incubées avec un anticorps primaire de lapin anti-FtsZ, suivi de l'incubation avec un anticorps secondaire dirigé contre l'immunoglobuline de lapin, couplé au fluorophore AF647. Les cellules immunomarquées ont été immergées dans un tampon de dSTORM, ensuite imagées selon un protocole d'imagerie PALM, puis imagées selon un protocole d'imagerie dSTORM. Barre d'échelle = 200 nm.

3. Synthèse du peptidoglycane

3.1 Introduction

La synthèse du PG a d'abord été observée en microscopie optique en utilisant des sondes fluorescentes dérivées des antibiotiques, comme la vancomycine, la bocilline, ou encore la céphalosporine par exemple (Daniel and Errington, 2003; Kocaoglu et al., 2012). La vancomycine reconnaît le dipeptide D-Ala-D-Ala présent dans les pentapeptides portés par le lipide II ou le PG nouvellement synthétisé, alors que la bocilline ou la céphalosporine, des antibiotiques de la famille des β -lactamines, se lient de manière covalente aux PBPs.

Un second type de marquage est basé sur l'utilisation de dérivés de la D-Ala. En 2012, des D-amino acides fluorescents ont été développés (FDAAs ou « **F**luorescent **D**-**a**mino **a**cids »), et ont permis le marquage du PG nouvellement synthétisé chez de nombreuses bactéries comme *E. coli*, *B. subtilis*, *A. tumefaciens*, *S. aureus*, *C. crescentus*, ou encore *S. pneumoniae* (Kuru et al., 2012) (Voir paragraphe 3.5 de la section Introduction). Cette technologie a été utilisée dans un grand nombre d'études, qui ont permis des avancées dans la compréhension de la physiologie de nombreuses bactéries (Pour une revue complète voir (Radkov et al., 2018)). Les FDAAs peuvent être utilisés en microscopie de fluorescence conventionnelle (qui permet d'obtenir une résolution spatiale d'environ 250 nm) ou en microscopie SIM (Structured illumination microscopy), qui permet d'atteindre une résolution deux fois supérieure (environ 110 nm) (Wegel et al., 2016). La résolution spatiale du SIM reste toutefois insuffisante pour visualiser le processus de synthèse du PG au sein de la région d'assemblage des machineries morphogénétiques chez le pneumocoque car l'épaisseur axiale de l'anneau Z varie de 95 à 127 nm (Jacq et al., 2105). C'est pourquoi nous avons décidé de développer une méthode de marquage de la synthèse du PG basée sur des dérivés de D-amino acides mais permettant une observation en dSTORM, qui permet d'atteindre une résolution spatiale de l'ordre de la dizaine de nanomètres (voir paragraphe 3.4.3 de la section *Introduction*).

3.2 Résultats

1. Conception de sondes pour visualiser la synthèse du peptidoglycane en dSTORM

Les FDAAs ont de multiples avantages : ce sont de petites molécules facilement synthétisables, qui n'inhibent pas la croissance des bactéries, et qui sont utilisables chez un très grand nombre d'espèces bactériennes. Les FDAAs disponibles au début de ma thèse n'étaient pas utilisables en dSTORM, c'est pourquoi nous avons dû développer des dérivés de D-Ala adaptés à cette technique.

Un des fluorophores les plus couramment utilisés en dSTORM est l'**Alexa Fluor 647 (AF647)**. Il s'agit d'un fluorophore de la famille des cyanines, très brillant (c'est-à-dire qui émet un très grand nombre de photons), donc apportant une excellente précision de localisation (Dempsey et al., 2011). De façon analogue aux FDAAs, nous avons envisagé de synthétiser des dérivés de D-Ala directement couplés à ce fluorophore. Cependant, une des stratégies de marquage consiste en l'import d'un dipeptide à l'intérieur de la bactérie pour incorporation dans le lipide II. Il nous semblait donc qu'une molécule AF647-D-Ala-D-Ala serait trop volumineuse pour rentrer efficacement dans la cellule et/ou pourrait bloquer la synthèse du lipide II. De plus, synthétiser plusieurs dérivés D-Ala associés à des fluorophores différents aurait été un travail très long et coûteux.

Pour pallier à ces problèmes de synthèse et de marquage, nous avons décidé de mettre en place une méthode basée sur la chimie click.

La **chimie click** regroupe un ensemble de réactions chimiques dites biocompatibles, permettant d'établir une liaison covalente entre deux molécules, dans des conditions de réaction simple (Kolb et al., 2001). Une des méthodes de chimie click les plus utilisées en biologie est la réaction de **cycloaddition azide-alkyne (AAC)**. Cette réaction permet la création d'une liaison covalente entre un azide et un alkyne, qui peut être catalysée soit par la présence de cuivre dans le mélange réactionnel (Rostovtsev et al.; Tornøe et al., 2002), soit par l'utilisation d'un dérivé du cyclooctyne, le **dibenzocyclooctyne (DIBO)** par exemple, comme

support pour l'alkyne, ne nécessitant plus de catalyseur extérieur (Agard et al., 2004) (Fig.18).

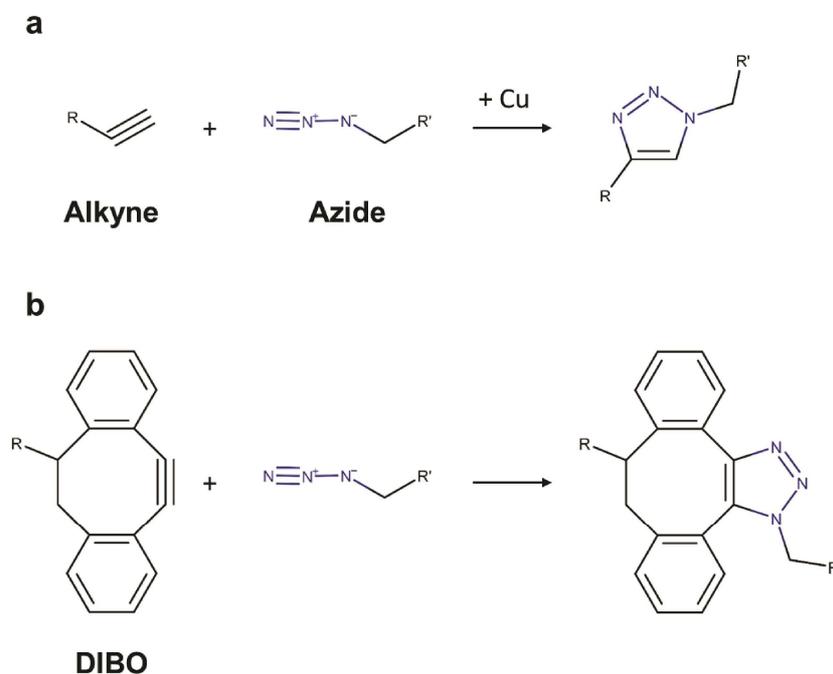


Figure 18 : Réaction de cycloaddition azide-alkyne (AAC). (a) Réaction AAC catalysée par du cuivre (CuAAC). (b) Réaction AAC spontanée (SPAAC), la tension du cycle cyclooctyne entraîne une diminution de l'énergie d'activation et permet à la réaction d'avoir lieu à température ambiante, en l'absence de catalyseur.

Deux stratégies étaient possibles : coupler la D-Ala au groupement azide qui se lierait à une cyclooctyne, ou à l'inverse coupler la D-Ala à une cyclooctyne qui réagirait avec un azide. Le composé azide-D-Ala est structuralement plus proche de la D-Ala que le composé DIBO-D-Ala, ce qui réduit les risques d'encombrement stérique lorsque la molécule est intégrée au PG (Fig. 19a). De plus, il est possible de trouver dans le commerce des fluorophores couplés au DIBO ou à d'autres cyclooctynes. Nous avons donc choisi de coupler les dérivés de D-Ala à l'azide.

Afin de tester les deux voies d'incorporations des D-aminoacides (voie extracellulaire par l'activité TP des PBPs pour les simples D-Ala ; voie intracellulaire de biosynthèse du lipide II et activité GT des SEDS et PBPs pour les dipeptides D-Ala-

D-Ala ; voir paragraphe 3.5 de la section *Introduction* pour une description des mécanismes d'incorporations), notre collaborateur (Y-S Wong) a synthétisé les composés suivants : azide-D-alanine (zDA), azide-D-alanyl-D-alanine (zDADA), et D-alanyl-D-alanine-azide (DADAz) (Fig. 19).

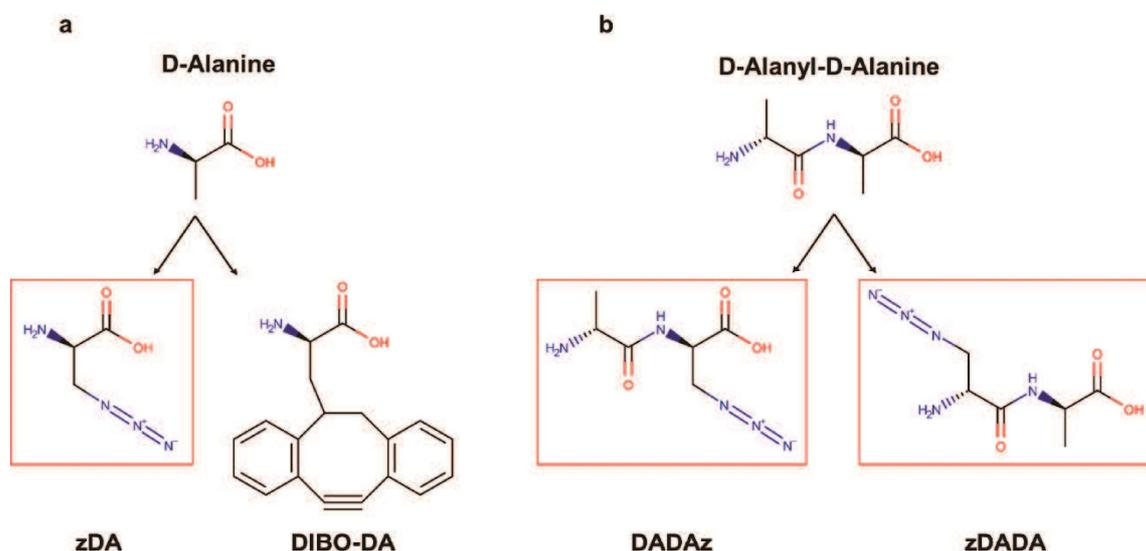


Figure 19 : Conception des réactifs pour le marquage de la synthèse du PG. (a) Pour lier la D-alanine au fluorophore il y a deux possibilités, ajouter un groupement azide à la D-alanine qui réagira avec un fluorophore couplé à une molécule de DIBO, ou ajouter la molécule de DIBO sur la D-alanine, afin de la faire réagir avec un fluorophore azidé. Afin de limiter le plus possible les risques d'encombrement stérique, nous synthétisé la version azidée de la D-alanine. (b) Afin de tester l'incorporation du dipeptide D-alanyl-D-alanine, il est possible de disposer le groupement azide sur le carbone β en position N-terminale ou C-terminale du dipeptide. Nous avons synthétisé les deux molécules afin de tester l'influence de la position du fluorophore sur le marquage du PG. Les molécules synthétisées sont encadrées en rouge. zDA : Azide-D-alanine, DIBO-DA : Dibenzocyclooctyne-D-alanine, DADAz : D-alanyl-D-alanine-azide, zDADA : Azide-D-alanyl-D-alanine.

2. Le zDADA est la molécule qui permet le meilleur marquage.

Nous avons testé les 3 réactifs par une méthode de marquage en deux étapes incluant une réaction de chimie click : en bref, les cellules en phase de croissance exponentielle sont incubées sur de courtes durées (5 minutes) avec les dérivés de D-aminoacides (DAAs), période au cours de laquelle ces molécules sont intégrées au PG. Les cellules sont ensuite fixées pour bloquer l'incorporation de DAAs, lavées, puis incubées en présence de DIBO-AF647 qui va se lier de façon covalente aux DAAs (Kuru et al., 2012; Liechti et al., 2014).

Avec le zDA (incorporé au PG par l'activité TP des PBPs), nous observons un marquage faible dans la zone de synthèse du PG, difficilement distinguable du bruit de fond observé à la surface des cellules (Fig. 20). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela. Sachant que le zDA permet de marquer les chaînes peptidiques en position 5 (dernière D-Ala), il est possible que la majorité du zDA incorporé ait été clivé par la D,D-carboxypeptidase DacA ou par l'activité transpeptidase des PBPs, car la proportion de pentapeptides chez le pneumocoque n'excède pas 3% (Bui et al., 2012). Il est possible également que l'activité d'échange de la D-Ala terminale par du zDA ne soit pas suffisamment efficace pour obtenir une densité de marquage satisfaisante en dSTORM, bien que suffisante pour une imagerie en fluorescence conventionnelle. Afin d'explorer ces hypothèses, nous avons décidé d'utiliser la seconde voie d'incorporation des D-aminoacides marqués (via la voie de biosynthèse du lipide II et l'activité GT des SEDS et PBPs), basée sur l'utilisation de dipeptides D-Ala-D-Ala. Nous avons donc marqué le PG naissant à l'aide des dipeptides DADAz et zDADA.

Nous observons un marquage tout aussi faible avec le DADAz qu'avec le zDA (Fig. 20). Le point commun entre les deux marquages est qu'ils permettent tous deux d'incorporer le groupement azide sur le 5^{ème} acide aminé de la chaîne peptidique du PG. Cette observation supporte donc l'hypothèse que le groupement azide incorporé en position 5 à l'aide du zDA et du DADAz est rapidement éliminé par clivage du 5^{ème} résidu des chaînes pentapeptidiques.

Le marquage par le zDADA en revanche a permis d'obtenir un signal très dense au niveau du site de division parental et des futures cellules filles (Fig. 20). Le zDADA permet l'incorporation du groupement azide sur le 4^{ème} acide aminé du peptide et

est incorporé dans le PG par la même voie que le DADAz (biosynthèse du lipide II et activité GT des SEDS et PBPs).

L'ensemble de ces observations suggère que la position de l'acide aminé marqué, plutôt que la voie d'incorporation du dérivé azidé, est importante pour obtenir un fort taux de marquage. Chez le pneumocoque, un marquage des chaînes peptidiques du PG en position 4 permet donc d'obtenir le meilleur rapport signal/bruit en imagerie dSTORM.

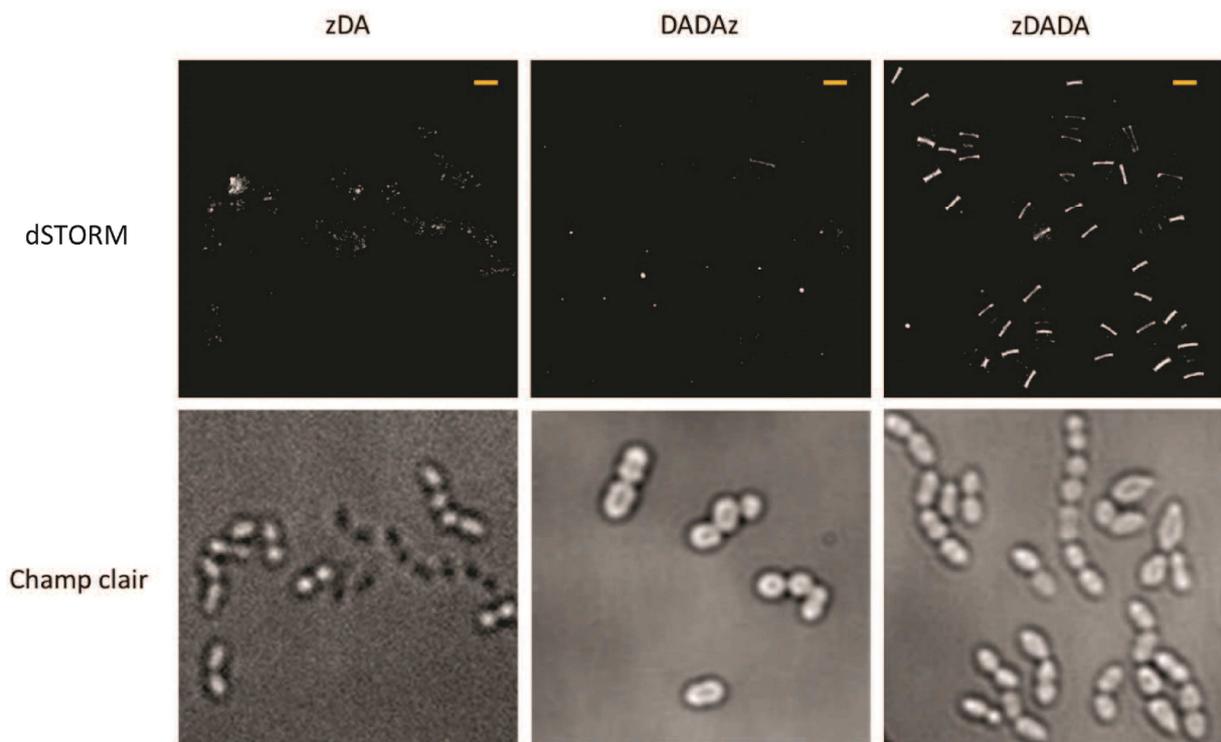


Figure 20 : Le dipeptide azidé en position N-terminale permet un meilleur marquage en dSTORM. Les cultures bactériennes ont été incubées pendant 5 min à 37°C en présence d'une des trois molécules à une concentration finale de 250 μ M, puis après fixation, les cellules ont été incubées dans une solution de PBS 1X contenant du DIBO-AF647 à une concentration de 10 mM. Les images du haut montrent les images reconstruite dSTORM, celles du bas correspondent au même champ de microscopie imagé en champ clair. zDA : Azide-D-alanine, DADAz : D-alanyl-D-alanine-azide, zDADA : Azide-D-alanyl-D-alanine. Barre d'échelle = 1 μ m.

3. Acquisition et analyse biophysique des images dSTORM.

Le marquage par le zDADA a permis d'obtenir environ 1308 +/- 664 localisations (n = 228) par cellule. Peu de temps avant la rédaction de ce manuscrit, une étude de la synthèse du PG en dSTORM chez *S. aureus* avait permis d'obtenir un nombre moyen de 683 localisations par cellule (Lund et al., 2018) (section réponse aux rapporteurs). Dans cette étude, le PG avait été marqué par chimie click à l'aide de zDADA, d'AF647-alkyne, en présence d'un catalyseur cuivre.

Le marquage du jeune PG par le zDADA a permis d'observer les zones de synthèse à une résolution inédite chez le pneumocoque. La précision de localisation, c'est-à-dire la distance minimale séparant deux molécules qui permet de localiser le centre de chacun des signaux fluorescents (voir la section *Matériel et méthodes*), est de 18 ± 5 nm. La résolution spatiale des images reconstruites, directement reliée à la densité d'échantillonnage au niveau des structures observées (voir la section *Matériel et méthodes*), a été évaluée à partir de 110 cellules et estimée à 18 nm.

Ce niveau de résolution a permis de révéler des détails non visualisables en microscopie de fluorescence conventionnelle, et de faire des mesures précises des dimensions des zones de synthèse du PG. En nous basant sur le profil de localisation des zones de synthèse du PG, sur la morphologie des cellules observées en champ clair et sur le diamètre de la zone de synthèse parentale, nous avons classé les cellules en trois groupes, correspondant à des étapes successives du cycle cellulaire. La 1^{ère} étape (**étape I**) correspond aux cellules qui synthétisent du PG au niveau de leur équateur, et qui ne présentent pas de constriction apparente à ce site. A cette étape la zone annulaire marquée par le zDADA a un diamètre compris entre 1200 nm et 800 nm. La 2nd étape (**étape II**) correspond aux cellules qui présentent clairement une constriction au milieu de la cellule mais ne montrent pas d'activité de synthèse du PG dans la zone équatoriale des deux futures cellules filles. A cette étape la zone annulaire marquée par le zDADA a un diamètre compris entre 850 nm et 550 nm. Enfin, la 3^{ème} étape (**étape III**) correspond aux cellules en fin de division : un marquage est encore observé au niveau du site de division parental et deux nouveaux sites de marquage sont observés à l'équateur des futures cellules filles (Fig. 21a). A cette étape, la zone annulaire parentale marquée par le zDADA a un diamètre inférieur 650 nm.

4. La zone de synthèse du peptidoglycane évolue similairement à l'anneau Z au début de la division et s'en dissocie par la suite.

Sur un échantillon de 238 cellules analysées, 62 % des cellules étaient à l'étape I, 17 % à l'étape II, et 16 % à l'étape III. 4 % des cellules présentaient quant à elles une synthèse de PG atypique, sous la forme d'un « V » ou d'un double anneau par exemple (Fig. 21b). Les mêmes profils de localisation avec des statistiques similaires ont été observés lors de l'étude de FtsZ (couplée à la protéine photoconvertible spDendra2) en PALM (Jacq et al., 2015). En effet, dans cette étude, 57 % des cellules étaient à l'étape I, 24 % à l'étape II, et 15% à l'étape III (Fig. 21c). Etant donné que les deux études ont été effectuées en état de régime permanent (voir section *Matériel et méthodes*), nous pouvons considérer que la proportion de cellules dans une même étape du cycle cellulaire représente le temps relatif que dure cette étape. Nous pouvons estimer que la proportion de cellules à chaque étape de la division est similaire entre les deux expériences. En effet, il y a légèrement plus de cellules à l'étape I dans notre analyse, mais cela vient très probablement de la différence d'appréciation de l'expérimentateur dans l'analyse de quelques cellules pour lesquelles il est difficile de déterminer si la constriction a débuté ou non. Nous en déduisons que la machinerie de synthèse du PG est présente et active au site de division sur des durées similaires à la localisation de FtsZ.

Les diamètres de l'anneau de synthèse du PG et de l'anneau Z sont très proches dans les deux 1^{ères} étapes de la division. Pour les cellules à l'étape I, ces diamètres sont compris entre 1200 nm et 800 nm pour le PG marqué, et entre 1200 nm et 700 nm pour l'anneau Z. Pour les cellules à l'étape II, les diamètres de la zone de synthèse du PG et de l'anneau Z sont respectivement compris entre 850 nm et 550 nm, et entre 800 et 450 nm. En prenant en considération le fait que le PG est synthétisé à la surface de la cellule, et que FtsZ est localisée dans le cytoplasme, il y a une distance approximative de 50 nm entre les deux marquages, ce qui résulte en une différence de 100 nm au niveau du diamètre des zones annulaires de marquage. Nous pouvons donc supposer que les dynamiques de localisation (positionnement et vitesse de diminution du diamètre annulaire) de la zone de synthèse du PG et de l'anneau Z sont similaires pour les deux 1^{ères} étapes de la division. A l'étape III, la zone de synthèse du PG a un diamètre inférieur à 650 nm

contre 450 nm pour l'anneau Z, indiquant que la synthèse du PG est retardée par rapport à la constriction de l'anneau Z à la fin du cycle cellulaire. Cette observation est cohérente avec le découplage de la localisation des PBPs et de l'anneau Z observé par microscopie de fluorescence conventionnelle et 3D-SIM (Land et al., 2013; Morlot et al., 2003).

Toutes ces données nous permettent de confirmer que l'évolution de la zone de synthèse du PG est corrélée avec l'évolution de l'anneau Z, du début de la division jusqu'à ce que les deux cellules filles commencent leur cycle de division. A ce moment-là, la progression de la zone annulaire de synthèse du PG et celle de l'anneau Z se découpent jusqu'à la fin de la division de la cellule mère.

Durant chacune des trois étapes du cycle cellulaire, le diamètre de la zone annulaire de synthèse du PG diminue de manière statistiquement significative (Fig. 21d). La SMLM permet non seulement de mesurer des dimensions d'architecture de localisation, mais également d'estimer le nombre de molécules fluorescentes dans chaque structure observée. Contrairement au PALM, le dSTORM ne nous permet pas de quantifier de manière absolue le nombre de fluorophores, mais permet toutefois de compter et comparer le nombre de molécules imagées dans différentes cellules sur un même champ de microscopie. Le comptage des molécules imagées a révélé qu'il n'y a pas de différence significative d'incorporation de PG entre les étapes I et II alors que le diamètre de la zone d'incorporation chute de façon significative (Fig. 21d). L'étude PALM de FtsZ chez le pneumocoque avait également montré que le nombre de copies de FtsZ dans l'anneau Z ne diminue pas entre l'étape I et l'étape II, bien que le diamètre de l'anneau Z entre ces deux étapes diminue de façon significative (Jacq et al., 2015). Cette observation suggère que la capacité des filaments de FtsZ à échafauder la machinerie de synthèse du PG, ainsi que l'activité globale de cette dernière, ne varient pas entre les étapes I et II. Enfin lors de l'étape III, FtsZ est partiellement relocalisée à l'équateur des deux cellules filles, ce qui diminue le nombre de molécules au site de division de la cellule mère. Cette observation est corrélée avec le fait que le nombre de localisations relatives au marquage du PG dans la zone de synthèse parentale diminue également drastiquement entre les étapes II et III (Fig. 21d). Malgré un découplage dans la localisation de l'anneau Z et de la zone annulaire de synthèse du PG en fin de

division, l'activité de synthèse du PG évolue donc de façon cohérente avec la dynamique (vitesse de constriction, nombre de molécules) de l'anneau Z.

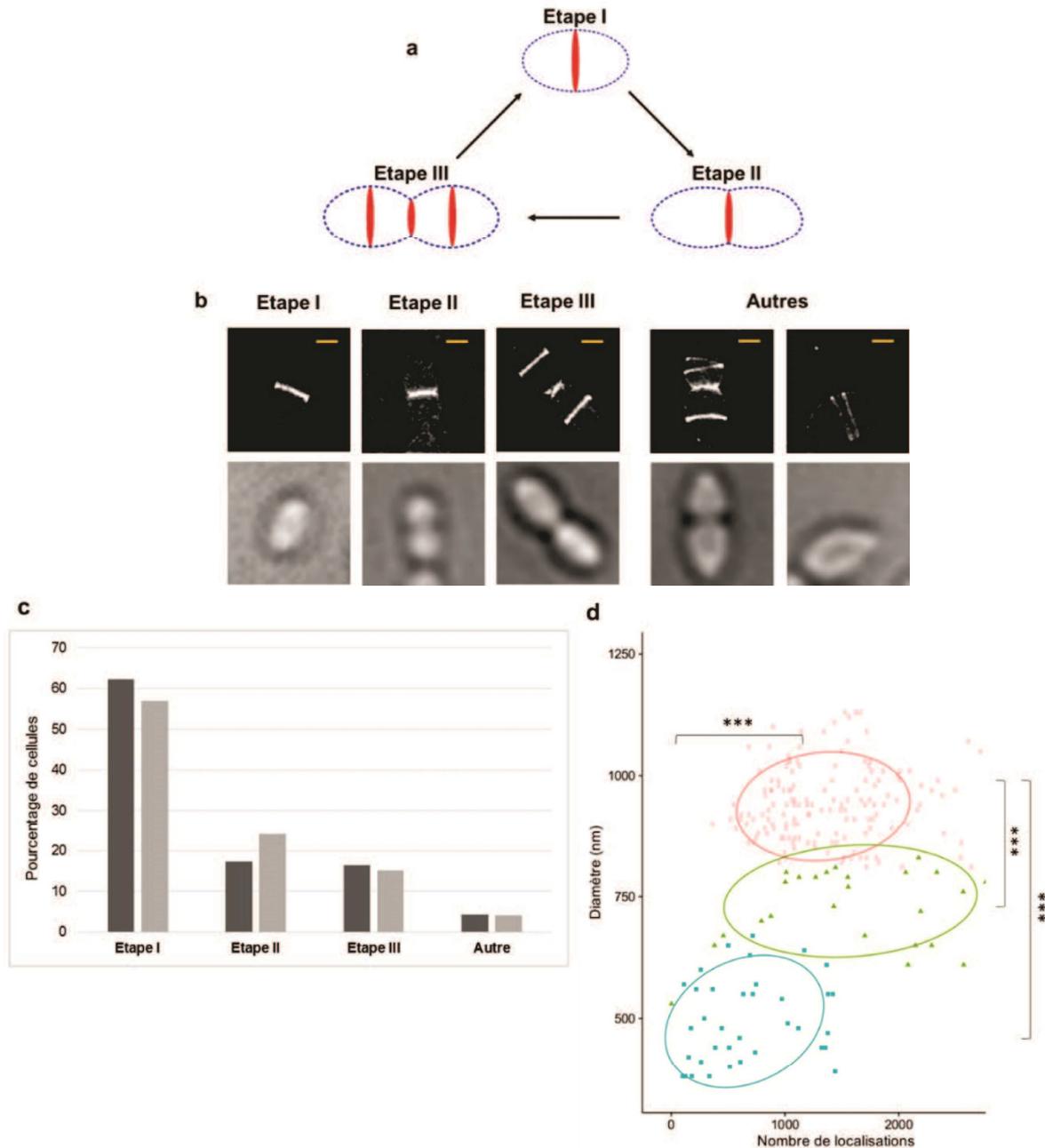


Figure 21 : Les trois étapes de la division du pneumocoque. (a) Schéma des trois étapes de la division du pneumocoque montrant les zones de synthèse du PG (zone rouge) et la morphologie de la cellule. (b) Cellules représentatives des différentes étapes schématisées en (a). Les cellules ont été incubées 5 min en présence de 250 μ M de zDADA, puis fixées, lavées et incubées en présence de 10 mM de DIBO-AF647. Barre d'échelle = 500 nm. (c) Comparaison du pourcentage de cellules à chaque étape de la division en fonction du marquage observé, zDADA (Gris foncé) ou FtsZ (Gris clair). (d) Dispersion de la population des cellules en terme de diamètre de la zone d'incorporation du PG, rapportée en fonction du nombre de localisations observées. Les trois populations correspondent aux cellules à l'étape I (Rouge), l'étape II (Vert), et l'étape III (Bleu). *** indique $p < 0,001$ (voir la section *Methodes* pour le test statistique utilisé).

5. La fermeture complète du septum n'a lieu qu'à la fin de la division.

Un des problèmes posés par la microscopie optique est que le signal que l'on observe est la somme des fluorophores présents dans la profondeur de champ, qui est dans nos expériences inférieure, mais toutefois relativement proche, du diamètre des cellules de pneumocoque (< 700 nm). Le pneumocoque, par sa forme ovoïde, se dépose systématiquement selon son axe longitudinal. Les profils de localisation observés sont donc généralement des lignes qui résultent de la projection 2D de régions annulaires selon l'axe radial de la cellule. Dans notre étude, cela pose problème car nous cherchons à connaître la structure fine de la région d'incorporation du PG, en particulier ici le septum (disque plein ou couronne circulaire de PG au centre de la cellule en division), il nous faut donc l'observer sous un autre angle.

Pour parvenir à imager la bactérie sous un autre angle, plusieurs stratégies peuvent être mises en place. Par exemple, il est possible d'utiliser des techniques de microscopie 3D telle que celle basée sur l'astigmatisme en SMLM. Une autre possibilité est de changer physiquement l'orientation des bactéries sur le support de microscopie. Cela peut être effectué de plusieurs manières, par dépôt des bactéries sur un support contenant des puits qui vont permettre d'orienter l'axe longitudinal de la bactérie à environ 90° par rapport au plan focal (Bisson-Filho et al., 2017). La méthode que j'ai choisie consiste à déposer l'échantillon entre deux lamelles hydrophobes qui vont laisser entre elles une plus grande distance que deux lamelles hydrophiles. Si la distance est suffisante, les cellules auront la possibilité de se placer dans presque toutes les orientations, ce qui permettra de les observer sous tous les angles. Il ne faut cependant pas que la distance entre les deux lamelles soit de plus de quelques micromètres sinon les bactéries bougent, ce qui est incompatible avec la SMLM, dont la durée d'acquisition peut dépasser 15 min.

Dans le but d'observer la structure du septum, les bactéries ont été incubées une heure en présence de zDADA afin de marquer le PG au cours d'un ou plusieurs cycles de division. Après fixation et ajout du fluorophore, les cellules ont été observées en dSTORM entre deux lamelles hydrophobes. On observe sur un champ de microscopie des cellules présentant plusieurs orientations, bien que la majorité se soit déposée le long de l'axe longitudinal (Fig. 22a). La première chose que nous

observons est que les cellules ont été marquées sur l'ensemble de leur surface mais que le marquage a un aspect granuleux et hétérogène. Cet aspect pourrait provenir du fait que les tétrapeptides (sous forme de monomères, dimères ou trimères) ne représentent que 23% des chaînes peptidiques du PG chez *S. pneumoniae* (contre 3% pour les pentapeptides et 45% pour les tripeptides) (Voir Annexe 3) (BuiVollmer2012). En effet, une partie des tétrapeptides est transformée par la L,D-carboxypeptidase DacB en tripeptides, et ces derniers ne porteront donc pas de marquage fluorescent.

En sélectionnant des cellules présentant un angle d'inclinaison par rapport à l'axe longitudinal, il nous est possible de visualiser la progression du septum (Fig. 22b). On observe globalement un signal plus fort au niveau du septum que sur le reste de la surface bactérienne. Nous pouvons proposer des hypothèses expliquant ce résultat. Tout d'abord, il se peut que la proportion de tétrapeptides soit plus importante au niveau du septum que sur le reste de la surface de la cellule. Il se peut également que le réseau de PG au niveau du septum soit plus dense que sur le reste de la surface cellulaire : le remodelage du septum (partition par des hydroplases du PG et possible insertion de PG) ainsi que la tension due à la pression osmotique (qui a pour effet de « tendre » mécaniquement le PG après partition du septum) pourraient espacer les fluorophores à la surface de la cellule.

Nous pouvons remarquer également qu'au tout début de la constriction le septum est presque absent, et que plus la division progresse, plus l'épaisseur radiale de la couronne septale s'agrandit. Cela suggère que la vitesse de progression des hydrolases impliquées dans la partition du septum est plus lente que celle de la machinerie de synthèse de PG septal à la fin du cycle cellulaire. Enfin, nous observons que le septum ne forme pas de disque avant la dernière étape du cycle cellulaire (Fig. 22b, image 8) ; des étapes 2 à 7, il forme une **couronne annulaire**. Cette observation est en accord avec des expériences de 3D-SIM réalisées par l'équipe de Malcolm Winkler qui n'ont montré la présence de disque septal qu'à des étapes très tardives du cycle cellulaire (Tsui et al., 2014a).

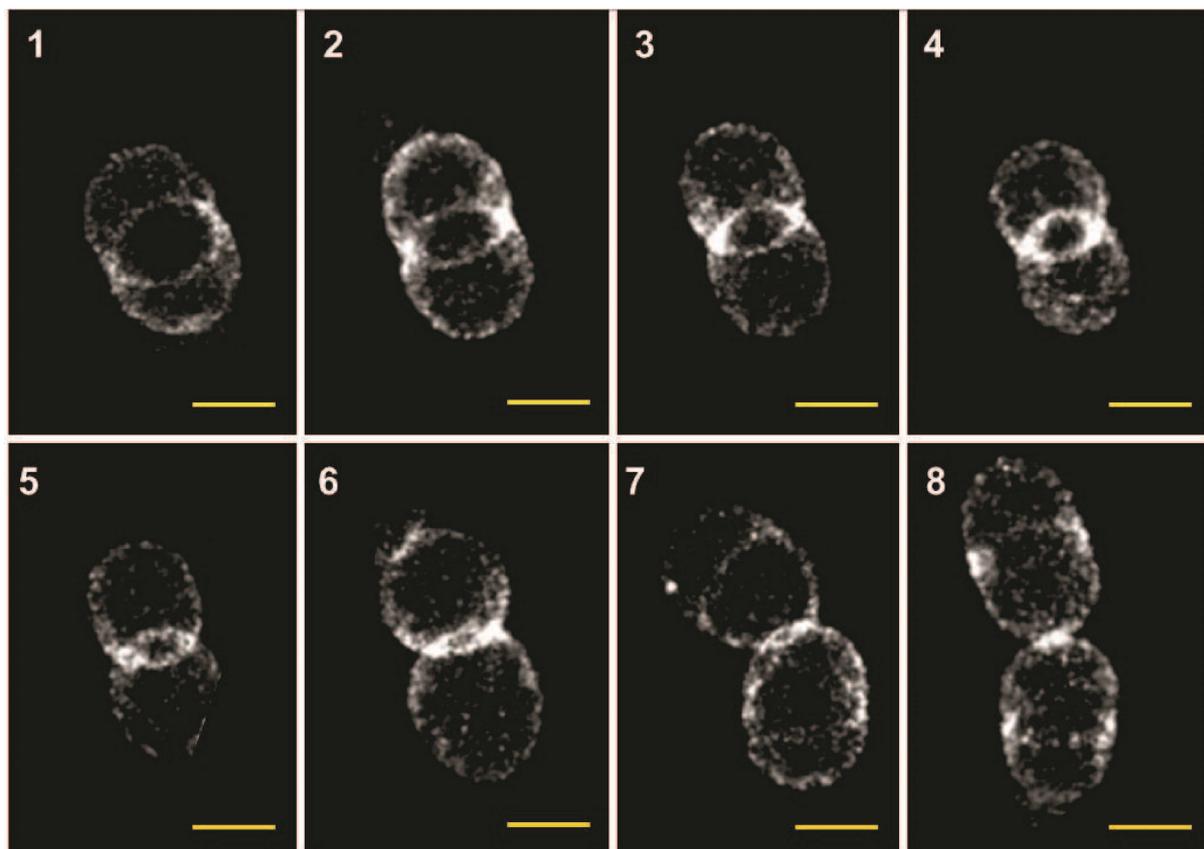
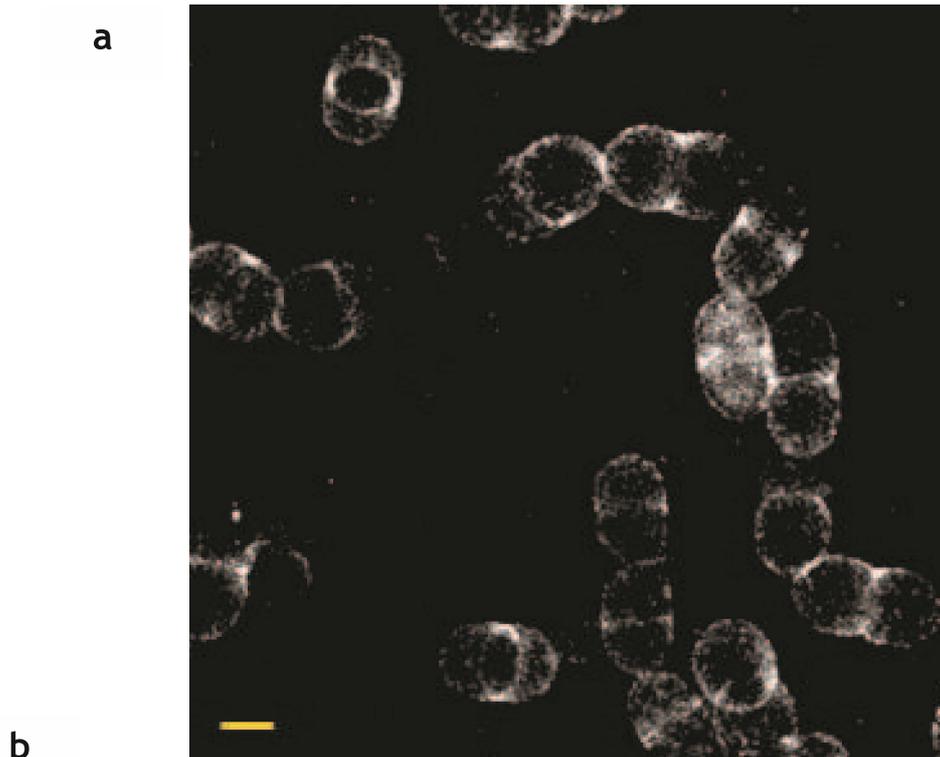


Figure 22 : Marquage du peptidoglycane chez *S. pneumoniae* au cours d'un cycle cellulaire complet et observation des cellules avec un angle d'inclinaison. Les cellules ont été incubées en présence de 250 μM de zDADA pendant 1 h, puis fixées, lavées et incubées en présence de 10 mM de DIBO-AF647. (a) Champ large de cellules de pneumocoque. (b) Cellules de pneumocoque à différentes étapes de la division, du début de la constriction (1) à la séparation des deux cellules filles (8). Barres d'échelle : 500 nm.

6. Le remodelage du septum joue un rôle essentiel dans l'élongation du pneumocoque

Le gain de résolution que nous apporte le dSTORM nous a permis de faire des mesures fines des dimensions de la zone d'incorporation du PG. Une des stratégies possibles pour comprendre comment le PG est synthétisé est d'observer le devenir du nouveau matériel. C'est pourquoi nous avons effectué une expérience dite de « pulse-chase » (impulsion-chasse). Cette expérience consiste à marquer le PG nouvellement synthétisé sur une courte période, comme nous l'avons fait précédemment, puis après élimination du zDADA non incorporé par lavage des cellules, à poursuivre leur croissance durant un temps donné. Pour mettre au point cette expérience il nous a d'abord fallu déterminer la durée d'incubation avec le zDADA qui est nécessaire et suffisante pour obtenir un marquage du PG observable en dSTORM. Cette durée devait être la plus courte possible pour obtenir la meilleure résolution temporelle possible dans nos expériences. Un marquage de 5 minutes semble être un bon compromis entre durée d'incubation et densité de marquage (Fig. 23). Nous avons également déterminé la durée de chasse minimale pour observer une modification de la région de PG marquée. Nous avons ainsi effectué une expérience de « pulse-chase » avec un marquage de 5 min, suivi d'une chasse de 15 min.

De la même manière que pour le simple marquage du PG, nous avons groupé les cellules observées dans différentes classes. Dans l'expérience de « pulse-chase », les différents profils de localisation du PG incluent des doubles anneaux, des formes en diabolo, du marquage polaire, ou encore des profils en forme de X encadrés par deux doubles anneaux. Nous pouvons observer également des cellules dont le marquage est intermédiaire entre ces différentes étapes. En comparant ces images à celles obtenues par simple marquage, il est possible de déterminer la chronologie des profils de fluorescence. En effet, les doubles anneaux ont un diamètre compris entre 1100 et 700 nm, ils apparaissent donc certainement dans des cellules ayant été marquées durant l'étape I. La forme en diabolo a un diamètre central (zone de constriction) compris entre 800 et 400 nm. Les cellules qui présentent ce profil en diabolo ont donc très certainement été marquées à l'étape II car à cette étape, le diamètre de la zone de constriction est compris entre 850 et 550 nm. Le profil en

forme de X encadré par deux doubles anneaux est évident à attribuer car il ne peut être issu que de cellules marquées à l'étape III, qui présentaient un anneau parental encadré par les anneaux de synthèse de PG des deux cellules filles.

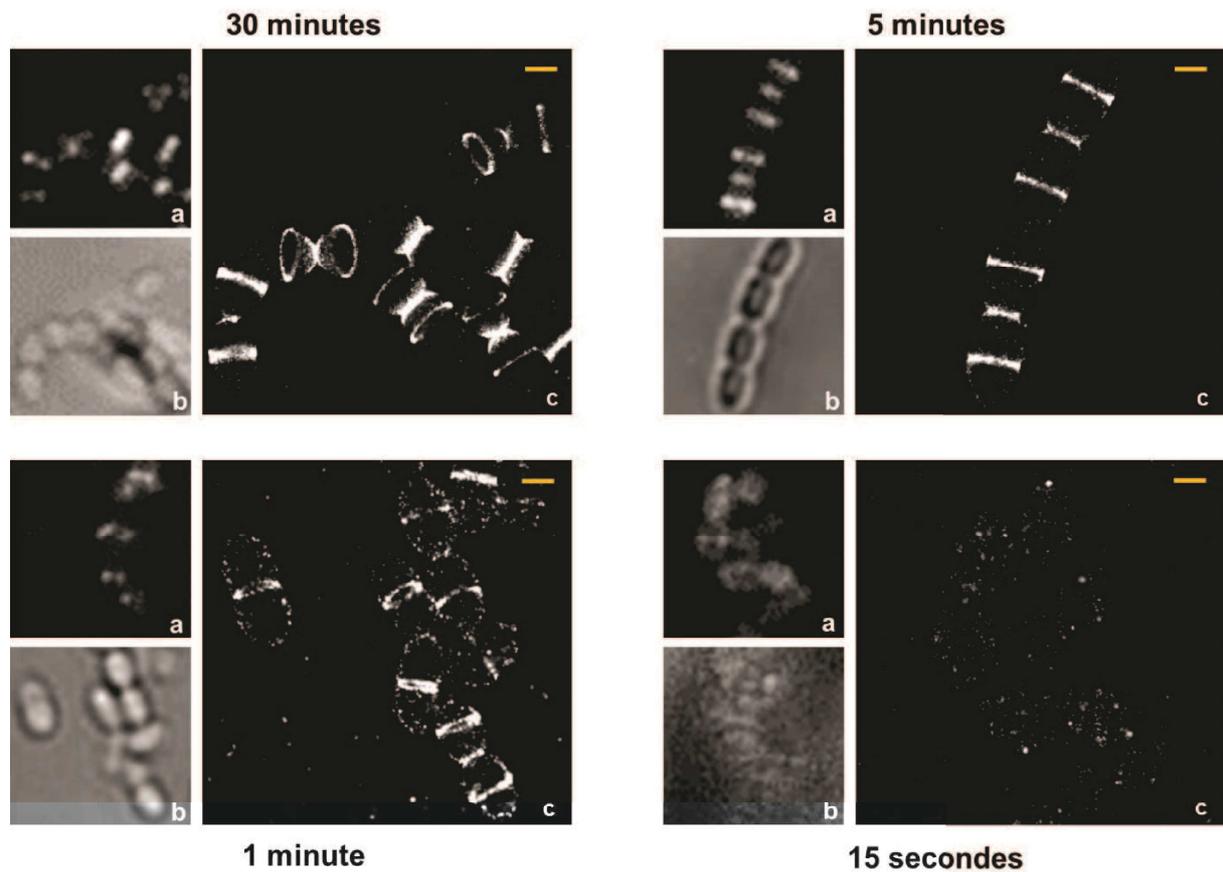


Figure 23 : Détermination de la durée optimale de marquage par le zDADA. Les cellules ont été incubées en présence de 250 μM de zDADA, puis fixées, lavées et incubées en présence de 10 mM de DIBO-AF647. La durée indiquée au-dessus des images correspond à la durée de l'incubation avec 250 μM de zDADA. Les images montrées sont des images de microscopie en champ clair (a), de microscopie de fluorescence conventionnelle (b) et de dSTORM (c). Barres d'échelle = 500 nm.

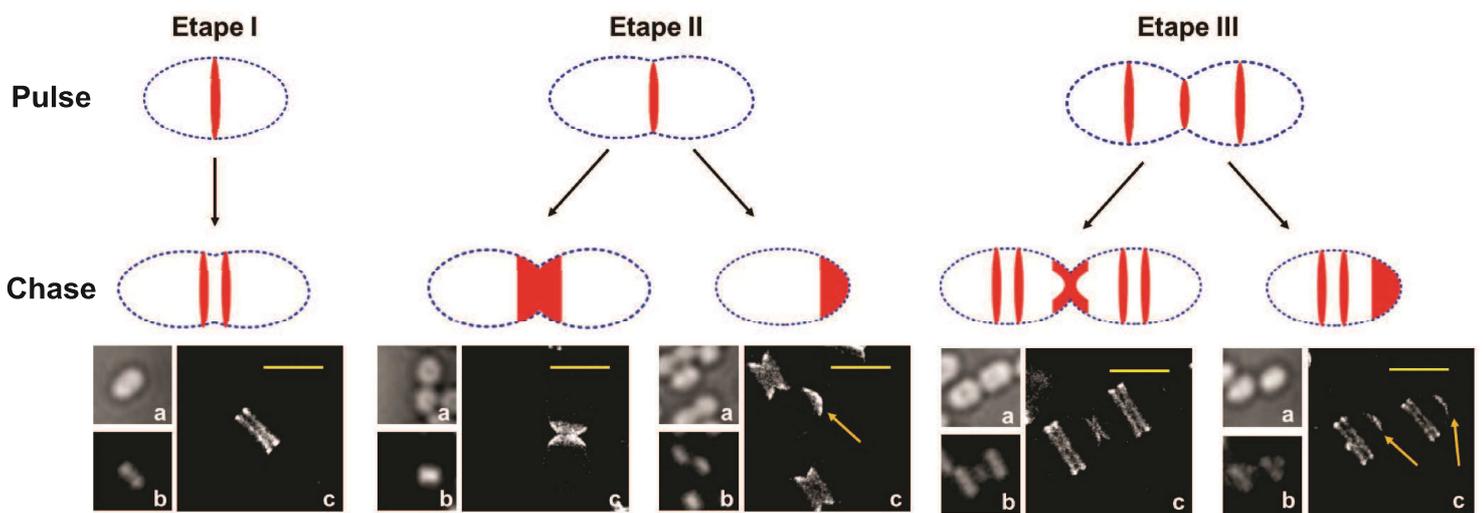


Figure 24 : La zone de PG marquée est chassée de différentes manières en fonction de l'étape de division. Ligne du haut : Représentation schématique du profil de localisation du PG marqué après la période de « pulse », pour chacune des trois étapes de la division. Ligne du milieu : Représentation schématique du profil de localisation du PG marqué après la période de « chase », pour chacune des trois étapes de la division. Ligne du bas : Cellules représentatives de chacune des 5 catégories de marquage observées après la chasse. Les cellules ont été incubées en présence de 250 μM de zDADA, lavées, incubées en absence de zDADA, puis fixées, lavées et incubées en présence de 10 mM de DIBO-AF647. Les images montrées sont celles en champ clair (a), en microscopie de fluorescence conventionnelle (b) et en dSTORM (c). Barres d'échelle = 1 μm .

Les marquages polaires de l'expérience de « pulse-chase » correspondent nécessairement à des septa fraîchement partitionnés, ils sont donc observés dans des cellules filles provenant d'une cellule mère qui avait déjà initié sa phase de constriction lors du marquage, qui était donc à l'étape II ou à l'étape III. Si la cellule présentant un marquage polaire a également un marquage équatorial, cela signifie que la cellule mère était à l'étape III de la division, étape à laquelle les futures cellules filles ont déjà initié la synthèse du PG au niveau de leur équateur. Durant la chasse, le septum a achevé sa partition, les cellules filles se sont séparées et ont synthétisé du PG non marqué au niveau de leur équateur. Au contraire, si seul un marquage polaire est visible, cela signifie que la cellule mère était à l'étape II de la division car les futures cellules filles n'avaient pas initié la synthèse de PG au niveau de leur équateur.

Afin de valider la chronologie que l'on vient d'établir, il est important de vérifier que la proportion de cellules à chaque étape de la division est identique entre les expériences de simple marquage et de « pulse-chase ». Alors que les étapes I, II et III représentaient respectivement 62%, 17% et 16% dans l'expérience de simple marquage, elles représentent 59%, 21% et 18% dans l'expérience de « pulse-chase » (Fig. 24). Les populations entre les différentes étapes sont donc sensiblement similaires entre les deux expériences, ce qui est cohérent avec la chronologie des événements que nous avons établi précédemment.

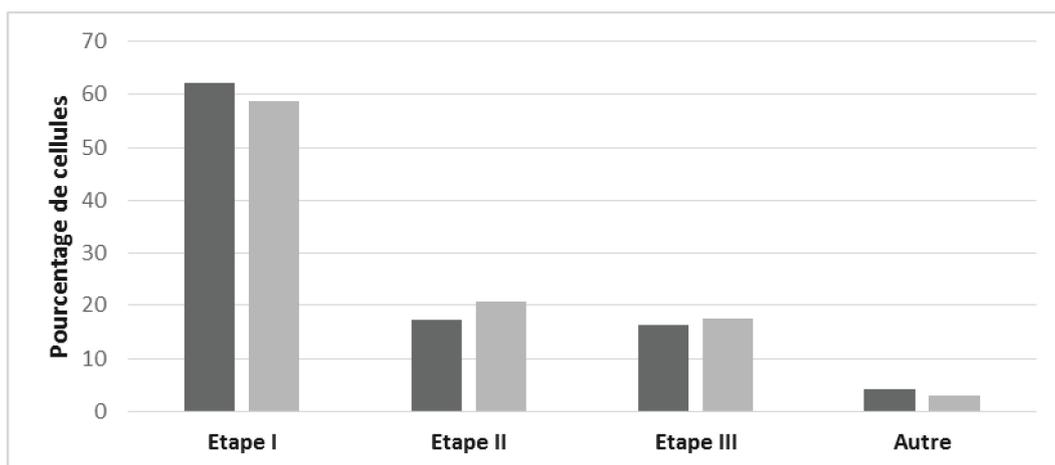


Figure 25 : La proportion de cellules à chaque étape de la division est conservée entre les expériences de simple marquage et de « pulse-chase ». L'expérience de simple marquage est représentée en gris foncé et l'expérience de « pulse-chase » en gris clair.

Nous observons une différence importante dans l'évolution des zones marquées lors de l'étape I et celles marquées lors de l'étape II.

Les cellules en début de cycle cellulaire n'ont pas de septum visible en microscopie électronique (Fig. 7 de la section *Introduction* et (Jacq et al., 2018)). Avant la phase de constriction, le PG synthétisé au temps $t+1$ va donc pousser le PG synthétisé au temps t de façon « latérale » ou « péripérique » par rapport au plan de division. Si le PG a été marqué au temps t , la période de chasse va partager la zone fluorescente en deux zones discrètes, séparées par une zone sombre au milieu, il s'agira du PG synthétisé au temps $t+1$ en absence de zDADA.

Dans les cellules à l'étape II, un septum (non fermé) est visible en microscopie électronique (Fig. 7 de la section *Introduction* et (Jacq et al., 2018)). Le septum est partitionné par des hydrolases (incluant PcsB chez le pneumocoque) du PG et la région septale va former les pôles des deux cellules filles. Lorsque le PG est marqué à l'étape II, la partition du septum au cours de la période de chasse va donc produire le marquage en forme de diabolos. Lorsque le marquage a eu lieu tardivement au cours de l'étape II, il arrive que la chasse se poursuive jusqu'à la séparation des cellules filles, c'est pourquoi nous observons quelques cellules isolées avec un marquage polaire. L'augmentation de la surface marquée après partition du septum est clairement visible lorsque l'on compare les expériences de « pulse » et de « pulse-chase » correspondant à l'étape II, et montre le rôle essentiel de ce phénomène dans l'élongation du pneumocoque. Nos expériences ne nous permettent pas aujourd'hui de déterminer si du nouveau PG est inséré dans la zone septale lors de sa partition. Cette hypothèse avait été suggérée par des expériences de modélisation mathématique réalisées à partir de coupes cellulaires d'*Enterococcus faecalis* observées en microscopie électronique (Higgins and Shockman, 1976) et est supportée par la présence de l'élongasome en périphérie du septum (Fig. 7), comme révélé par des expériences de 3D-SIM (Tsui et al., 2014). Sur la base de ces données, il est fort probable que l'élongasome insère du nouveau matériel dans la zone septale en cours de partition (en périphérie du septum).

Malgré ces points qui restent à éclaircir, nous pouvons toutefois conclure de nos expériences que l'élongation du pneumocoque résulte de l'insertion de PG « péripérique » au début du cycle cellulaire et du remodelage du septum. Le

remodelage du septum inclut l'hydrolyse partielle de ce dernier en son milieu (sa partition) pour permettre la séparation des cellules, très certainement une activité de synthèse par l'élongasome en périphérie du septum, et possiblement un autre type d'hydrolyse ménagée pour relâcher la tension du PG septal. Ces deux/trois types d'activité permettraient ainsi de générer la forme ovoïde des pôles du pneumocoque.

La très haute résolution obtenue à l'aide du dSTORM nous a permis de mesurer avec précision le diamètre de la zone annulaire de synthèse du PG. Nous pouvons également mesurer la largeur de cette zone après les périodes de « pulse » et de « pulse-chase » (Fig. 26). Dans l'expérience de « pulse », nous observons tout d'abord que la largeur de la zone d'insertion du PG dans les cellules à l'étape I est similaire à celle des cellules à l'étape II (75 ± 15 nm et 77 ± 21 nm, respectivement). Etant donné que le diamètre de cette zone de synthèse annulaire diminue, que sa largeur est constante, et que la quantité de PG produite est similaire entre l'étape I et l'étape II (Fig. 21.d), nous en déduisons qu'il y a en apparence plus de PG produit par unité de surface durant l'étape II que durant l'étape I. Sachant que la zone annulaire de synthèse est observée en projection 2D, cela peut signifier deux choses. Le réseau de PG produit lors de l'étape II pourrait être plus compact que celui produit lors de l'étape I. La diminution de surface de synthèse causée par la diminution de diamètre pourrait également être compensée par une augmentation de l'épaisseur radiale de la couronne septale. En d'autres termes, la circonférence du septum étant de plus en plus petite, **la machinerie de synthèse semble progresser plus rapidement vers le centre de la bactérie lors de la phase de constriction**. Nous observons enfin durant l'étape III un léger épaissement de la zone de synthèse du PG (94 ± 32 nm). Etant donné qu'il y a peu de paroi septale incorporée à cette étape (Voir la quantification des molécules imagées dans la figure 21d), elle est probablement remodelée en grande partie durant la durée du marquage.

En comparant la largeur des zones marquées dans l'expérience de « pulse-chase », nous observons que la région fluorescente dans les cellules marquées à l'étape II (largeur de la forme en diabolo) est légèrement plus large que dans les cellules marquées à l'étape I (distance entre les doubles bandes).

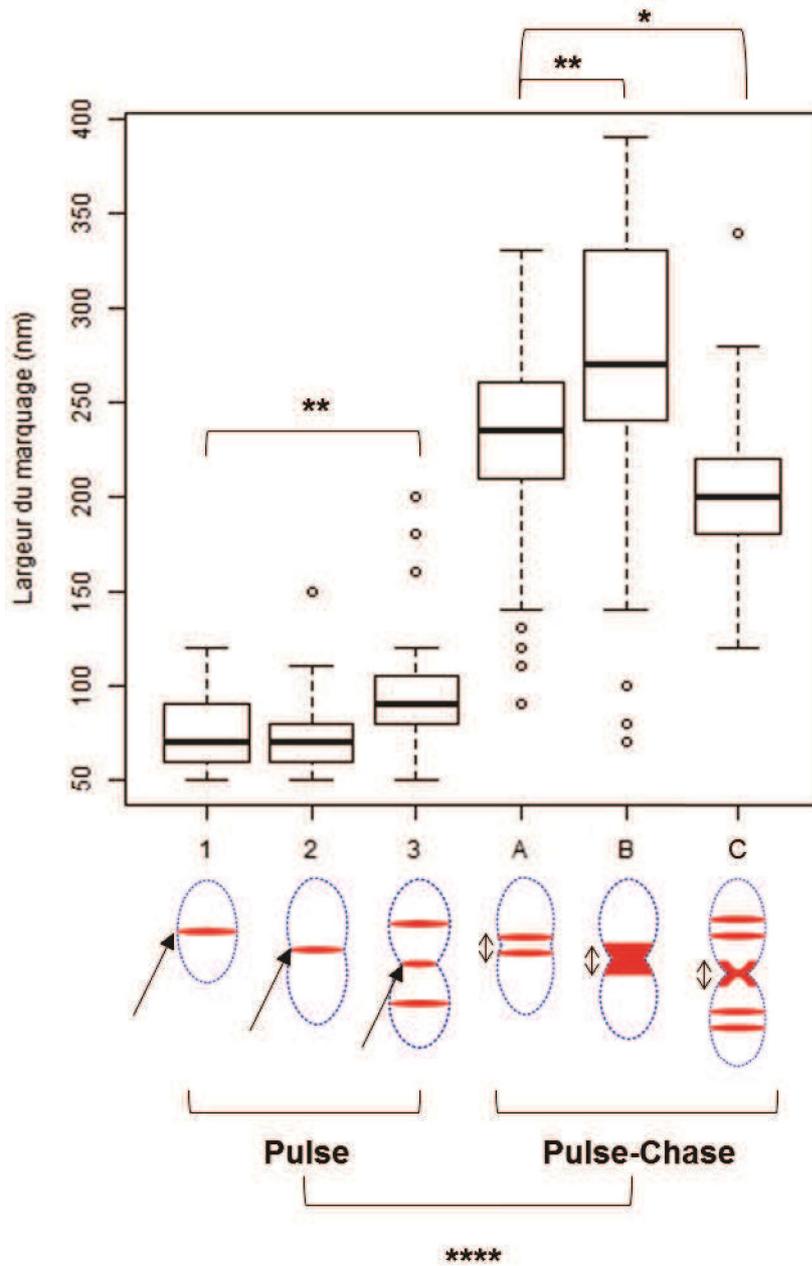


Figure 26 : Le remodelage du PG après sa synthèse entraîne un élargissement de la zone marquée. La largeur de la zone marquée est mesurée selon la méthode de la largeur à mi-hauteur du signal fluorescent. Les flèches noires montrent la région qui a été mesurée pour chaque profil de localisation. Dans le cas des doubles anneaux, la partie sombre du milieu est comprise dans la mesure. * signifie $p < 0,05$, ** signifie $p < 0,01$, **** signifie $p < 0,0001$.

Pour déterminer si la surface moyenne de synthèse du PG est identique entre les cellules marquées à l'étape I et à l'étape II, nous avons modélisé le profil en double bande comme un cylindre et le profil en forme de diabolo comme un double cône tronqué, et calculé la surface latérale dans ces deux modèles (Fig. 27).

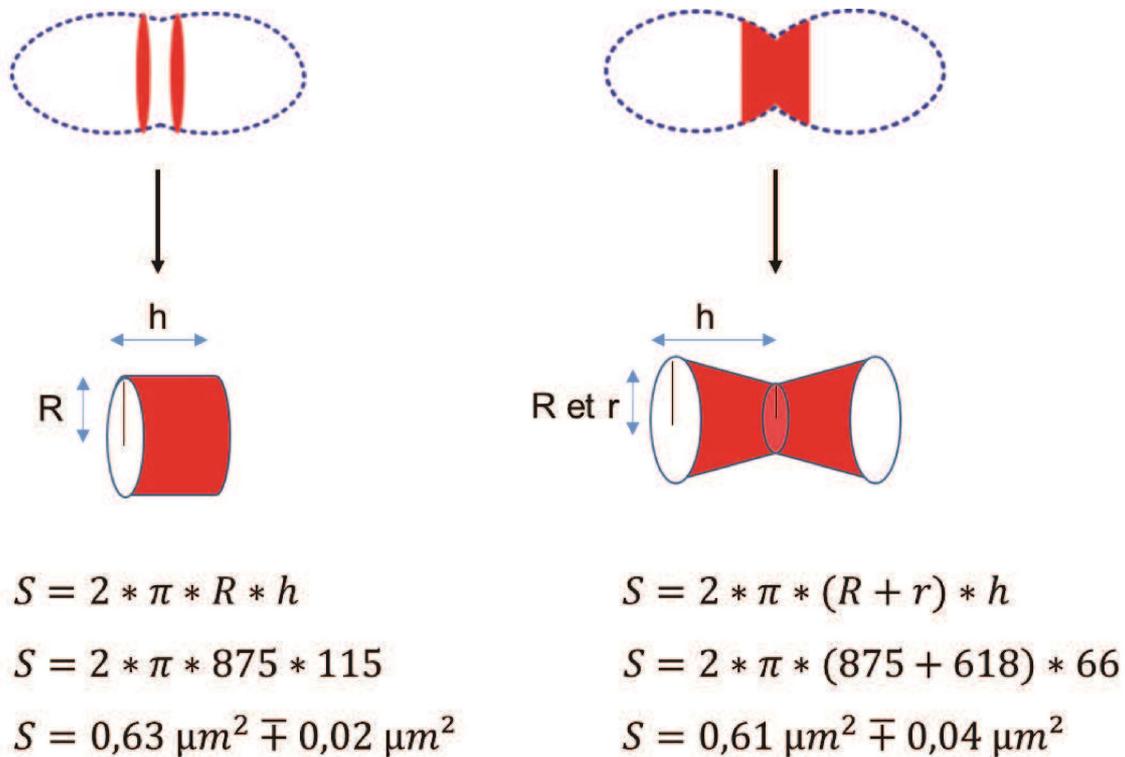


Figure 27 : Modélisation de la zone de marquage du PG à l'issue de l'expérience de « pulse-chase » et calcul de la surface marquée. La zone de PG synthétisé au cours de l'étape I peut être assimilée à un cylindre après la période de chasse (surface comprise entre les doubles bandes), alors que le modèle le plus proche du profil en diabolo (profil observé après la période de chasse des cellules marquées à l'étape II) est un double cône tronqué.

La surface mesurée dans les deux modèles est similaire ($0.63 \pm 0.02 \mu m^2$ pour le profil en double bandes contre $0.61 \pm 0.04 \mu m^2$ pour le profil en diabolo). Ceci indique que la surface de PG générée durant les deux premières étapes de la division est constante sur une durée donnée. En d'autres termes, **le remodelage du septum contribue à l'élongation du pneumocoque de façon équivalente (en termes d'extension de surface) à la synthèse périphérique de PG.**

7. Le peptidoglycane périphérique subit également un remodelage

Nous venons de voir que le septum est remodelé après sa synthèse. Nous nous sommes demandé si le PG périphérique subissait également un remodelage après sa synthèse.

Pour répondre à cette question, nous avons comparé la largeur (épaisseur axiale) de l'anneau simple de PG à l'étape I avec la largeur des deux anneaux observés après la période de chasse. Nous observons que chacun des deux anneaux au sein d'un double anneau est significativement plus large que l'anneau simple (75 ± 15 nm pour l'anneau simple et 105 ± 18 nm pour chacun des doubles anneaux). Un anneau marqué d'une largeur d'environ 75 nm a donc généré deux anneaux de largeur supérieure. **Le PG périphérique subit donc un remodelage après sa synthèse, qui augmente de manière importante la surface qu'il occupe.**

8. DivIVA est nécessaire à la division et à l'élongation du pneumocoque

Nous venons de voir que la technique de marquage de la synthèse du PG par le zDADA nous permet de distinguer en dSTORM les deux composantes de l'élongation du pneumocoque que sont la synthèse périphérique de PG (synthèse observée à l'étape I) et le remodelage du septum. Jusqu'à présent, un défaut d'élongation du pneumocoque était systématiquement mis sur le compte d'un défaut de synthèse périphérique de PG. Il est donc possible que certaines protéines aient été impliquées à tort dans la synthèse périphérique de PG, et qu'elles fassent en réalité partie d'une machinerie de remodelage du septum. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la triade formée par StkP et les paralogues DivIVA et GpsB, qui sont reconnues comme impliquées respectivement dans la synthèse périphérique et septale de PG.

Les souches $\Delta stkP$, $\Delta gpsB$ et $\Delta divIVA$ ont été fournies par notre collaborateur Christophe Grangeasse (MMSB, Lyon), qui les avait précédemment étudiées (Fleurie et al., 2012, 2014b). Dans ces souches, qui sont dérivées de la souche de laboratoire R800, aucune cassette de résistance à un antibiotique n'est présente dans la région du gène délété (voir la méthode « Janus » dans la section *Matériel et méthodes*). Les méthodes du simple marquage par le zDADA et du « pulse-chase » ont été appliquées afin d'observer la synthèse et le remodelage du PG dans ces souches.

Nous observons pour la souche délétée du gène *stkP* que certaines cellules ont une morphologie et une incorporation de PG similaires à celles de la souche sauvage, alors que d'autres ont une morphologie allongée avec des zones de synthèse de PG dédoublées et une absence de constriction des marquages septaux (Fig. 28). Ces observations diffèrent de celles rapportées dans une étude par Fleurie et al., dans laquelle la souche de délétion du gène *stkP* présente une morphologie arrondie, forme des chainettes et montre une désorientation du plan de division (Fleurie et al., 2012). Dans l'étude de Fleurie et al., les bactéries ont été cultivées dans un milieu riche appelé THY, alors que dans notre expérience les bactéries sont cultivées dans un milieu défini appelé CY. De plus, nos expériences ont été réalisées sur des cultures en état dit de « régime permanent », obtenu après plusieurs dilutions de cultures en phase exponentielle de croissance et permettant que l'ensemble des bactéries soient en phase de division active. Une morphologie allongée avait également été observée pour une souche de délétion de *StkP* cultivée en milieu CY (Beilharz et al., 2012). Il est connu chez le pneumocoque que la composition du milieu de culture affecte, parfois de manière drastique, la morphologie et la physiologie des bactéries.

Dans l'expérience de simple marquage sur les cellules Δ *stkP*, une des observations majeures est que le diamètre du septum parental à l'étape III semble plus large que dans la souche sauvage dans de nombreuses cellules. Cette observation, dont la validation nécessite encore de réaliser des mesures précises de ces septa, indique un défaut de constriction des cellules. Nos expériences ne nous permettent pas de déterminer si c'est la synthèse septale qui est ralentie ou si c'est le remodelage du septum qui est affecté. Une analyse de ce phénotype en microscopie électronique (sur des coupes de cellules pour observer les septa) pourrait permettre d'explorer ces deux possibilités. La deuxième observation majeure avec l'expérience de simple marquage est la présence de doubles bandes dans les cellules les plus allongées. Ces doubles bandes qui apparaissent en absence de période de « chasse » indiquent la présence des machineries de synthèse du PG sur un site double, alors que ces dernières se localisent sur un site unique au niveau de l'équateur de la cellule dans la souche sauvage.

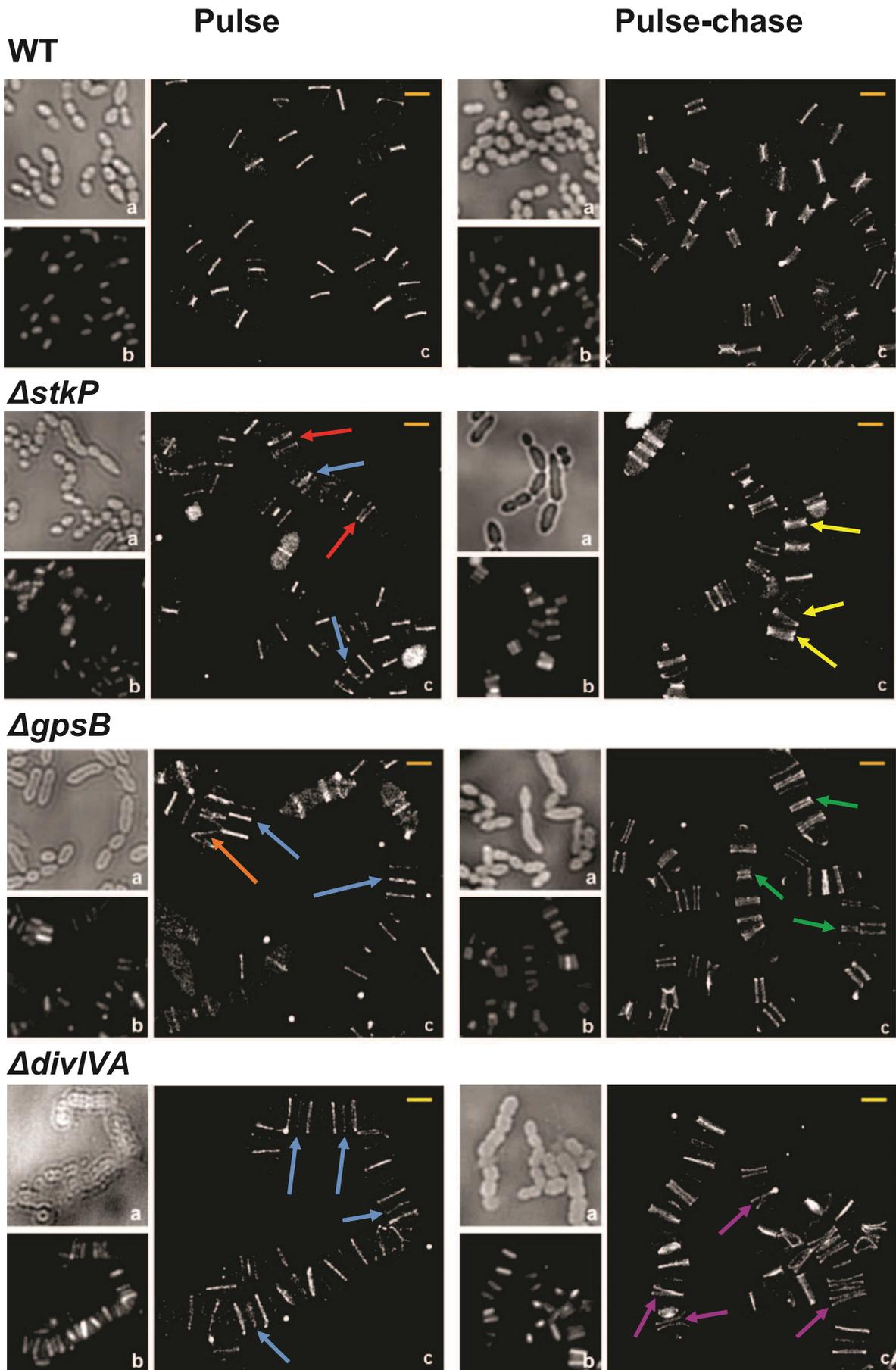
Dans l'expérience du « pulse-chase », la souche $\Delta stkP$ a les mêmes défauts morphologiques que dans l'expérience du simple marquage. Un nombre plus important de cellules présentent des profils en double bande comparé à l'expérience de simple marquage, il semble donc que la synthèse périphérique ne soit pas affectée. Un comptage des différents profils de localisation reste toutefois à effectuer pour vérifier cette hypothèse. Les marquages de type « diabolos » semblent quant à eux beaucoup moins nombreux que dans la souche de type sauvage, ce qui est corrélé au fait que la souche $\Delta stkP$ présente des défauts de division qui se manifestent par des morphologies allongées. De nombreuses cellules présentent enfin des profils de fluorescence larges et diffus (flèches jaunes sur la figure 28), qui pourraient résulter d'un remodelage déficient du septum ou du remodelage des régions de synthèse doubles observées dans l'expérience de simple marquage. L'ensemble de ces observations suggère donc que dans nos conditions expérimentales, **l'absence de StkP affecte davantage la septation que la synthèse périphérique**. Une étude plus complète de cette souche permettra de définir quel est la composante de la septation - synthèse du septum et/ou remodelage du septum (partition, activité de synthèse de l'élongasome, putative hydrolyse ménagée) - qui est défectueuse.

Pour la souche de délétion de *gpsB* (fournie par C. Grangeasse) nous observons que les cellules sont de tailles très variées, avec une prépondérance de cellules allongées, indiquant un défaut de division comme rapporté dans des études précédentes réalisées par les groupes de C. Grangeasse et M. Winkler (Fig. 28) (Fleurie et al., 2014b; Rued et al., 2017). Dans la souche $\Delta gpsB$, nos expériences de simple marquage suggèrent en plus que la chronologie des événements de synthèse du PG dans la cellule mère et les cellules filles est perturbée. En effet, dans les cellules sauvages, les deux cellules filles débutent la synthèse du PG quasiment en même temps, lorsque la cellule mère est à l'étape III du cycle cellulaire et donc que le septum parental montre une forte constriction. En absence de GpsB, les différences d'intensité et/ou de diamètre des anneaux de synthèse du PG observés dans les cellules filles indiquent que ces dernières débutent la synthèse du PG de façon asynchrone. Par ailleurs, de façon consistante avec la morphologie allongée des cellules $\Delta gpsB$, les diamètres des zones de synthèse parentales semblent

globalement plus larges que dans la souche de type sauvage, en particulier à l'étape III, suggérant que la synthèse du septum est ralentie ou que son remodelage est défectueux. Une mesure des dimensions des zones marquées permettra de valider ces observations. Enfin, nous observons parfois une zone de synthèse du PG de forme hélicale, similaire aux observations rapportées par Fleurie et al. (Fleurie et al., 2014b).

L'analyse de l'expérience de « pulse-chase » de la souche *ΔgpsB* montre que la synthèse périphérique fonctionne correctement chez ce mutant puisque l'on observe l'apparition des doubles bandes caractéristiques de la synthèse de PG périphérique. De façon intrigante, les cellules ayant largement initié leur phase de constriction (cellules vraisemblablement marquée à l'étape II) ne présentent pas de profil de fluorescence en diabolo mais présentent des doubles bandes avec une zone sombre au milieu, comme dans les cellules marquées à l'étape I. Cette observation suggère que le septum dans cette souche n'est pas synthétisé correctement. Nos expériences ne nous permettent pas aujourd'hui de savoir quelle est la composante affectée (synthèse septale plus lente ou vitesse d'hydrolyse du septum plus rapide) mais les images de microscopie électronique publiées par l'équipe de C. Grangeasse semblent indiquer que la synthèse septale est déficiente (Fleurie et al., 2014b). **GpsB semble donc en effet être impliquée dans la promotion de la synthèse septale de PG, mais semble également importante pour la synchronicité de la synthèse du PG dans les cellules filles.**

Figure 28 : Morphologie et synthèse du peptidoglycane de souches mutées pour les gènes codants pour la triade StkP/GpsB/DivIVA. Pour chaque souche, une expérience de simple marquage a été effectuée (colonne « Pulse »), ainsi qu'une expérience de « Pulse-chase » (colonne « Pulse-chase »). Pour chaque champ de microscopie, trois images sont montrées : (a) le champ clair montrant la morphologie des bactéries observées, (b) Le marquage fluorescent observé en microscopie conventionnelle, (c) le marquage fluorescent observé en dSTORM. Les flèches rouges indiquent des marquages en doubles bandes dans la souche *ΔstkP*. Les flèches bleues montrent des cellules ayant une faible constriction, mais dans lesquelles les cellules filles ont déjà commencé à synthétiser du PG au niveau de leur équateur. Les flèches jaunes correspondent à des septa présentant des profils de fluorescence larges et diffus dans la souche *ΔstkP*. La flèche orange indique un marquage fluorescent de forme hélicoïdale dans la souche *ΔgpsB*. Les flèches vertes montrent des cellules en constriction mais présentant un marquage en double bande. Les flèches violettes indiquent des marquages en double bande présentant une asymétrie. Barres d'échelle : 1 μm pour (a) et (b) et 500 nm pour (c).



La troisième souche étudiée est la souche de délétion du gène *divIVA*. Il a été montré que les cellules de cette souche sont arrondies, forment de longues chaînes, et ont des septa complets mais non séparés (Fleurie et al., 2014b). De ces observations, il a été déduit que DivIVA est impliquée dans la synthèse périphérique de PG et dans la séparation des cellules filles.

L'expérience de simple marquage par le zDADA de la souche $\Delta divIVA$ montre des cellules dont la morphologie est similaire au phénotype rapporté dans la littérature (Fig. 28). En effet, on observe des septa parentaux de large diamètre, y compris dans les cellules à l'étape III (cellules dans lesquelles les cellules filles ont initié la synthèse du PG à leur équateur), ce qui indique un défaut de synthèse septale ou de remodelage du septum. Cette observation est corrélée avec les défauts de division présentés par cette souche. En revanche, nous n'observons pas d'autres défauts apparents comme des hélices par exemple. Les défauts de division de cette souche sont différents de la souche $\Delta gpsB$. En effet, bien que les septa de la souche délétée du gène *gpsB* présentent des degrés de constriction hétérogènes et que la constriction semble ralentie, la constriction ne semble toutefois pas bloquée puisque les cellules ne forment pas de chainettes. Les septa de la souche $\Delta divIVA$ au contraire semblent à peu près tous bloqués à une même étape précoce, et la souche forme de longues chainettes.

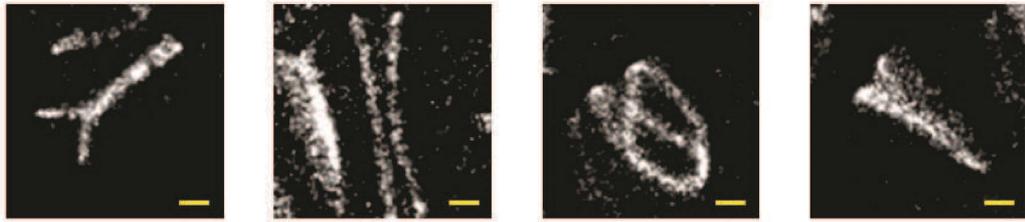
L'expérience de « pulse-chase » dans la souche $\Delta divIVA$ montre des marquages très différents les uns des autres. Nous observons de manière très étonnante des marquages en doubles bandes, qui indiquent que la synthèse périphérique de PG est active. Cependant, ces doubles bandes sont parfois légèrement asymétriques, comme observé sur la 2^{ème} image de la figure 29a. Il semblerait donc que, contrairement à ce qui a été précédemment proposé, **la synthèse périphérique soit toujours active en absence de DivIVA, mais que l'homogénéité ou la régularité du processus de synthèse soient affectées.**

Dans les cellules $\Delta divIVA$, nous n'observons pas de profil de localisation de type « diabolo », caractéristiques du remodelage du septum des cellules marquées à l'étape II. Cela n'est pas étonnant car un nombre extrêmement faible de cellules semble avoir atteint le niveau de constriction associé au profil de type « diabolo ». L'arrondissement des cellules (leur moindre élongation) proviendrait donc, tout

comme le phénotype en chaînette, d'un blocage du remodelage du septum. Une des possibilités est que DivIVA permette la transition entre l'étape I et l'étape II de la division. Si tel était le cas, les cellules resteraient à l'étape I et il n'y aurait pas de signe visible de constriction (pas de cellules aux étapes II et III). Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé la proportion de cellules à chaque étape de la division pour les deux souches. Etonnement, il apparaît que la proportion de cellules à l'étape I et aux étapes II+III soit similaire entre les deux souches (Fig. 29b). En effet, la souche sauvage et la souche $\Delta divIVA$ possèdent respectivement 62 % et 58 % des cellules à l'étape I. Les étapes II et III sont confondues dans la souche $\Delta divIVA$ car la constriction parentale est tellement ralentie que lorsqu'un signe de constriction apparaît au niveau du site de division parental, les cellules filles ont déjà commencé à synthétiser du PG au niveau de leur équateur. En absence de DivIVA, la majorité des cellules qui ne sont pas à l'étape I présentent donc un profil de localisation qui se rapproche de l'étape III. Nous avons donc comparé la proportion du nombre total de cellules aux étapes II et III dans la souche sauvage et $\Delta divIVA$. Cette proportion s'élève à 34 % et 39 % dans la souche sauvage et dans la souche $\Delta divIVA$, respectivement. **Nous déduisons de ces observations que DivIVA ne semble pas impliquée dans l'initiation de la constriction septale mais est nécessaire à la progression de cette dernière et au remodelage du septum.**

Dans l'expérience du « pulse-chase » de la souche $\Delta divIVA$, de nombreuses cellules présentent un profil de fluorescence asymétrique par rapport à l'axe longitudinal de la cellule (Fig. 29a). Cela prend majoritairement la forme d'un Y (Fig. 29a, 1^{ère} image à gauche) ou d'un anneau courbe (Fig. 29a, 2^{ème} image). Lorsque ce défaut est présent dans des cellules présentant un angle d'inclinaison par rapport à l'axe longitudinal (Fig. 29a 3^{ème} image), il apparaît que la forme en Y est la représentation en 2D d'une structure annulaire scindée en deux dans le plan transversal. Il est intéressant de constater que dans ces cellules, la zone de PG marquée semble plus large au niveau des deux branches du Y qu'au niveau du « pied » du Y.

a



b

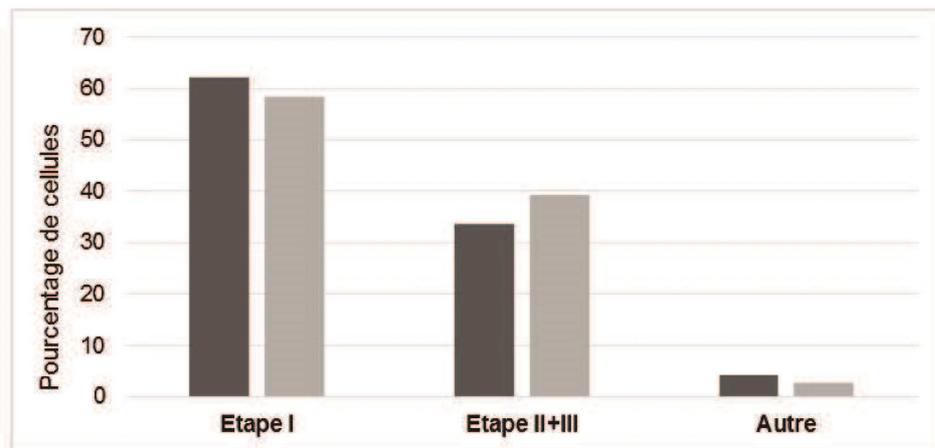


Figure 29 : La souche $\Delta divIVA$ présente des défauts de synthèse du PG. (a) Images dSTORM de cellules $\Delta divIVA$ observées après une expérience de « pulse-chase ». Les deux premières images correspondent à des cellules présentant un profil en Y, soit un profil de type « double bande » asymétrique. La troisième image montre un profil de localisation similaire à celui observé sur la 1^{ère} image mais avec un angle d’inclinaison. La quatrième image montre une chase qui pourrait correspondre aux prémices d’un « diabolo », mais qui se forme de façon asymétrique. Barre d’échelle : 200 nm. (b) Proportion de cellules à différentes étapes du cycle cellulaire pour la souche sauvage (Gris foncé) et la souche $\Delta divIVA$ (Gris clair).

Ces observations indiquent que bien que l’absence de DivIVA dérégule les mécanismes de synthèse et de remodelage du PG, ces derniers ne sont pas complètement inhibés. Cela est en accord avec le fait que certaines cellules parviennent quand même à se diviser, donc à synthétiser et remodeler leur septum. Nos expériences de « pulse » et de « pulse-chase » ne nous permettent pas de déterminer si la zone comprise entre les deux branches de PG marqué contient du PG. Cette information permettrait de savoir si le profil de marquage asymétrique résulte d’une synthèse asymétrique ou d’une hydrolyse asymétrique dans cette région de la cellule. Pour répondre à cette question, nous envisageons de réaliser

une expérience de « pulse-chase » pour marquer le PG et marquer ensuite la surface de la bactérie à l'aide d'un AF532 couplé à un groupement NHS. Ceci nous permettra de déterminer si l'espace compris entre les deux branches de la fourche est comblé ou vide.

Bien que le rôle de DivIVA reste encore mystérieux, nos observations en dSTORM suggèrent qu'elle n'est pas impliquée dans la promotion de la synthèse de PG périphérique ou dans la transition de l'étape I vers les phases de constriction (phases II et III), mais qu'elle est plutôt impliquée dans la régularité de la synthèse de PG (périphérique et/ou septal) et dans le remodelage du septum. Pour investiguer le rôle de DivIVA plus en profondeur, une observation des cellules $\Delta divIVA$ en microscopie électronique (coupes fines) permettra de déterminer si les septa sont synthétisés et/ou hydrolysés de façon complète et régulière.

Discussion

La synthèse du PG et les mécanismes de régulation associés est un champ d'étude très dynamique. En effet, alors que les premières études sur la paroi des bactéries remontent au XIX^e siècle, des découvertes majeures et des changements de paradigme ont eu lieu depuis le début du XXI^e siècle, en relation étroite avec l'avènement de nouvelles techniques expérimentales. A titre d'exemple, les progrès en biochimie et cristallographie des protéines a permis la découverte de l'homologie entre certaines protéines bactériennes (FtsZ, MreB, FtsA, ou EzrA par exemple) et les protéines du cytosquelette eucaryote (Voir chapitre 2.2.5 de la section *Introduction*) (Cleverley et al., 2014; van den Ent et al., 2001; Jones et al., 2001; Löwe and Amos, 1998; Nogales et al., 1998). Cette découverte apporte non seulement un éclairage sur la physiologie des bactéries, mais nous renseigne plus globalement sur les relations évolutives entre les différents domaines du vivant. Plus récemment, les évolutions majeures de la microscopie optique associée à de nouvelles technologies de marquage ont apporté une compréhension sans précédent de la dynamique des complexes morphogénétiques au cours du cycle cellulaire bactérien (Bisson-Filho et al., 2017; Yang et al., 2017).

Durant ma thèse, j'ai exploité ces développements récents pour revisiter les processus de la morphogénèse chez un ovocoque, la bactérie pathogène opportuniste *Streptococcus pneumoniae*. En particulier, j'ai utilisé la microscopie de localisation de molécules uniques, une technologie de pointe permettant d'obtenir des résolutions de l'ordre du nanomètre en microscopie de fluorescence.

Vers la nano-structure comparée de FtsZ et d'EzrA

Dans le but de mieux comprendre comment l'anneau Z échafaude les protéines de la division et de synthèse du PG, nous avons cherché à adapter une méthode de super-résolution à 2 couleurs chez le pneumocoque, pour observer dans une même cellule la nanostructure de FtsZ et d'un de ses partenaires. Nous avons choisi la

protéine EzrA pour mettre au point cette méthode. EzrA est une protéine du cytosquelette présente chez un grand nombre de bactéries à Gram positif, impliquée dans la régulation de l'assemblage de l'anneau Z, mais également dans la liaison entre FtsZ et les protéines de synthèse du PG. Nous avons d'abord créé une souche de pneumocoque exprimant la protéine EzrA fusionnée avec une protéine photoconvertible spDendra2, utilisable en PALM. Nous avons montré que la protéine de fusion était fonctionnelle et utilisable pour obtenir des images en microscopie super-résolue. Nous avons ensuite tenté de mettre au point une méthode de super-résolution à 2 couleurs PALM-dSTORM afin d'observer les protéines FtsZ et EzrA dans une même cellule. Nous avons réussi à collecter des données de localisation en 2 couleurs, mais nous n'avons pas réussi à obtenir de co-localisation satisfaisante pour une expérience contrôle dans laquelle une fusion FtsZ-spDendra2 était observée simultanément en PALM et en dSTORM. Ce problème a remis en cause la technique choisie (co-localisation PALM-dSTORM) pour comparer la nanostructure de FtsZ avec son partenaire et a contrecarré l'acquisition de données exploitables. L'idée pour la suite de ce projet est de se diriger vers des méthodes alternatives telles que le PALM-PALM ou le dSTORM-dSTORM en 2 couleurs. La seconde partie de mon sujet de thèse donnant des résultats plus prometteurs, j'ai mis de côté le projet de co-localisation de FtsZ et d'EzrA afin de me consacrer entièrement à l'imagerie de la synthèse du PG en dSTORM.

Imagerie super-résolue de la synthèse du PG

De grand progrès ont été effectués ces dernières années en ce qui concerne le marquage du PG, mais au départ de ma thèse, les observations restaient limitées à une résolution de l'ordre de 100 nm (par SIM), soit environ le dixième de la longueur d'une cellule de pneumocoque. Pour dépasser cette limite de résolution et observer des détails nouveaux dans la synthèse du PG, nous avons développé une stratégie qui allie des méthodes établies de marquage du PG, de chimie click et de dSTORM. La méthode développée nous a permis d'imager la synthèse du PG à une résolution de l'ordre de la vingtaine de nanomètres et a mis en évidence des phénomènes qui n'avaient encore jamais été observés. Toutes les étapes du cycle cellulaire d'un ovocoque (*S. pneumoniae*) ont pu être imagées. En revanche, notre marqueur étant

inséré directement dans le précurseur du PG (le lipide II), il révèle certainement l'activité de toutes les enzymes possédant une activité glycosyltransférase (PBBs de classe A et SEDS). Il faut donc rester prudent quant à l'interprétation des profils de fluorescence et la corrélation avec les différentes machineries morphogénétiques.

Nous avons effectué des mesures de dimensions de la zone de synthèse du PG chez le pneumocoque durant les différentes phases du cycle cellulaire, ce qui a révélé que durant les premières étapes de la division, la zone annulaire de synthèse de PG diminue en diamètre mais que son épaisseur axiale reste constante, contrairement à ce qui a été montré pour l'anneau Z (Jacq et al., 2015). Cela suggère que la machinerie de synthèse du PG reste confinée dans les membranes localisées de part et d'autre du septum bien que la zone d'assemblage de l'anneau Z soit variable. La largeur du septum mesurée sur des images de microscopie électronique est d'environ 25 nm chez le pneumocoque (Zucchini et al., 2018), tandis que la largeur moyenne de la zone de synthèse du PG mesurée sur nos images de dSTORM est de 75 nm. Nous pouvons donc supposer que le profil de fluorescence observé correspond à la zone active de synthèse du PG, mais également à une légère chasse due à l'intégration des 5 minutes de marquage (période de « pulse »).

Nous avons également effectué une quantification relative de la quantité de PG synthétisé, ce qui a montré que cette dernière est constante au cours des étapes I et II. Le fait que la largeur de la zone de synthèse et la quantité de PG marqué n'augmentent pas entre l'étape I et l'étape II, alors que le diamètre de la zone annulaire de synthèse diminue, suggère que la machinerie de synthèse progresse vers le centre du site de division, ce qui est consistant avec la synthèse d'un septum. Toutefois, le marquage du PG sur une durée supérieure au cycle de division (~ 30 min) montre que le septum du pneumocoque ne se ferme que très tardivement au cours de la division. Ces résultats sont cohérents avec des études en 3D-SIM et AFM (microscopie à force atomique) chez le pneumocoque (Wheeler et al., 2011).

Le remodelage du peptidoglycane septal joue un rôle essentiel dans l'élongation du pneumocoque.

D'après le modèle de morphogenèse du pneumocoque communément admis (voir figure 30, Modèle 1), le cycle cellulaire débute par une phase d'élongation provenant de la synthèse périphérique de PG par l'« élongasome » (PG de couleur orange dans le modèle 1 de la figure 30). Cette étape est également appelée synthèse de PG pré-septal. Par la suite, un complexe protéique appelé « divisome » synthétise du PG septal dans le plan de division pour former le septum (PG de couleur bleue dans le modèle 1 de la figure 30). Le septum est ensuite remodelé afin de constituer les pôles oblongs des deux cellules filles.

Le phénomène de **remodelage du septum**, assez peu défini à l'heure actuelle, nécessite la **partition du septum** pour former les pôles des deux cellules filles. Ce mécanisme fait intervenir des **hydrolases du PG** (seule PcsB a été impliquée à ce jour dans l'hydrolyse du septum chez *S. pneumoniae*). Sachant que, lors de la phase de constriction (étapes II et III), l'élongasome est toujours présent en périphérie du septum (Voir Fig. 7 de la section *Introduction*), le remodelage du septum pourrait impliquer une **activité de synthèse de la part de l'élongasome**.

Dans le modèle 1 de la figure 30, la composante de l'activité de synthèse de l'élongasome au cours de la phase de constriction est prise en compte, mais l'interprétation des phénotypes morphologiques de souches mutantes reste souvent binaire : un défaut d'élongation est associé à la participation du gène muté dans l'élongasome et la synthèse périphérique mais n'est que rarement associé à un remodelage du septum.

Nos observations en dSTORM du PG néo-synthétisé dans une souche sauvage et une souche mutante de *S. pneumoniae* qui ne s'allonge pas (*ΔdivIVA*, discutée dans le paragraphe suivant) montrent que le remodelage du septum est responsable d'une part importante de l'élongation chez cette bactérie et suggère que **l'activité combinée de l'élongasome et du divisome permette de générer un réseau de PG dont les propriétés physiques contribuent à la forme ovoïde du pneumocoque.**

La protéine DivIVA n'est pas impliquée dans la synthèse de PG pré-septal mais dans le remodelage du septum

Les cellules de la souche de délétion de DivIVA sont plus courtes que les cellules de la souche sauvage, signe que DivIVA joue un rôle dans l'élongation du pneumocoque. Le rôle du remodelage du septum dans l'élongation ayant été négligé, il a été proposé que DivIVA soit impliquée dans l'élongasome et la synthèse périphérique (pré-septale) de PG (Fleurie et al., 2014b; Straume et al., 2017). Nous avons montré qu'après la chasse du PG marqué, le profil fluorescent en double bande, caractéristique de la synthèse de PG pré-septal, était toujours visible en absence de DivIVA, indiquant que cette dernière n'est **pas nécessaire à la synthèse de PG pré-septal**. De plus, la souche $\Delta divIVA$ possède un défaut de séparation des cellules filles évident, indiquant que **DivIVA est impliquée dans la partition du septum**.

L'implication de DivIVA dans l'élongasome et/ou le divisome reste à éclaircir mais nos travaux montrent que l'interprétation du rôle d'une protéine sur la base unique de la morphologie cellulaire peut mener à des erreurs qui faussent les modèles proposés. A l'image de ce travail réalisé sur DivIVA, il serait intéressant de revisiter le rôle de l'ensemble des protéines impliquées dans l'élongation, voire même dans la division, du pneumocoque. Il se pourrait que **d'autres protéines de l'élongasome soient en fait nécessaires au remodelage du septum plutôt qu'à la synthèse pré-septale**.

Vers un nouveau modèle de la morphogénèse des ovocoques ?

Tout d'abord, il est important de rappeler que le terme de « septum » est l'apparition d'une cloison de PG au centre de la cellule en division. Il ne doit pas être confondu avec le terme de « PG septal » qui est le PG synthétisé de manière centripète par le divisome. Le septum est constitué de PG septal, mais le PG septal peut ne pas former de septum si sa partition (hydrolyse ménagée) est aussi rapide que sa synthèse.

Par ailleurs, il est important de signaler que les termes « élongasome » et « divisome » sont source de confusion car ils supposent que l'élongasome ne soit

impliqué que dans l'élongation de la cellule, et que le divisome ne soit impliqué que dans la septation. Or nos données indiquent que le remodelage du septum participe à l'élongation de la cellule de façon équivalente à la synthèse pré-septale (périphérique), et nous savons que les deux machineries de synthèse du PG sont présentes dans la région septale lors de ce remodelage : l'élongasome reste en périphérie du septum alors que le divisome se localise au niveau du front de progression centripète du septum dans les dernières étapes de la division (Tsui et al., 2014b). L'ensemble de ces données suggère donc que l'élongasome participe lui-aussi en quelque sorte à la division (à travers le remodelage du septum) et que le divisome participe à l'élongation en produisant du PG qui constituera les pôles de la cellule après remodelage.

Nos images de dSTORM permettent pour la première fois de visualiser cette **intrication entre élongation et septation**. Et cette observation, ainsi qu'un certain nombre d'autres données rapportées dans la littérature, remettent en cause le modèle actuellement admis de la morphogénèse des ovocoques.

Tout d'abord, à l'image de DivIVA, la délétion ou la déplétion d'autres protéines de l'élongasome (MreC, MreD, PBP2b et RodA) entraînent un défaut de séparation des cellules (Straume et al., 2017). L'élongasome dans son ensemble pourrait être associé non pas à une synthèse pré-septale mais au remodelage du septum. Notons toutefois que ces deux activités ne sont pas exclusives.

De plus, nous avons montré que le PG pré-septal subit un remodelage au même titre que le PG septal. Ce phénomène n'avait jamais été observé et n'est donc pas inclus dans le modèle actuel de la morphogénèse des ovocoques (Fig. 30, Modèle 1).

Une autre observation importante est que deux des représentants majeurs du divisome et de l'élongasome, respectivement PBP2x et PBP2b, arrivent en même temps au site de division et sont tous deux recrutés par FtsZ au début du cycle cellulaire (Fleurie et al., 2014b; Morlot et al., 2003; Tsui et al., 2014b). L'élongasome et le divisome ne forment donc pas deux complexes physiquement distincts au début du cycle cellulaire.

Enfin, les bactéries en phase d'élongation pré-septale observées par microscopie électronique possèdent un renflement dirigé vers l'intérieur de la cellule au niveau

de l'équateur (Higgins and Shockman, 1970; Tomasz et al., 1964). Ce renflement ressemble à un prémice de septum et suggère que le divisome pourrait être actif dès le début du cycle cellulaire.

Ces différentes observations suggèrent que le complexe protéique appelé « divisome » est actif en même temps que « l'élongasome » dès leur recrutement au site de division. Dans ce cas, il devrait y avoir synthèse concomitante de PG septal et de PG pré-septal dès le début du cycle cellulaire. Si le PG septal formait un septum dès le début du cycle cellulaire, alors le profil en diabolo (lors de l'expérience de « pulse-chase ») devrait être observé dans toutes les cellules, y compris dans celles qui sont en phase précoce de division. Cette prédiction n'étant pas vérifiée dans nos images de dSTORM, une hypothèse alternative serait que le PG synthétisé par le divisome ne forme pas de septum à cette étape-là mais soit remodelé immédiatement par les hydrolases ET par l'élongasome. Ce modèle est consistant avec le fait que le PG pré-septal subisse lui-aussi un remodelage. Ainsi, **le PG pré-septal pourrait être en fait du PG septal dont la vitesse de remodelage est équivalente à la vitesse de synthèse**, prévenant l'apparition d'un septum (figure 30, Modèle 2). Dans ce modèle, **le divisome synthétiserait le PG septal et l'élongasome catalyserait son remodelage en combinant des activités de synthèse et d'hydrolyse.**

Un nom plus approprié pour l'« élongasome » serait donc plutôt « **remodelasome** »

Dans les phases plus tardives du cycle cellulaire, l'apparition du septum (qui implique que la vitesse de synthèse soit supérieure à la vitesse d'hydrolyse), résulterait soit d'un ralentissement de l'activité du remodelasome, soit d'une augmentation de l'activité du divisome (Fig. 30b-c). Les différents profils de localisation attribués à de la synthèse pré-septale ou à de la synthèse septale ne seraient donc dus qu'à des différences dans les vitesses de progression du divisome et du remodelasome vers le centre du plan de division (le point de fermeture du septum). La création de surface étant constante au cours des étapes I et II, (Fig. 27) l'hypothèse la plus probable serait que le remodelasome ait une activité constante durant ces deux étapes et que ce soit la progression plus rapide du divisome vers le centre du plan de division qui permette l'apparition du septum.

L'avantage de ce modèle est qu'il simplifie grandement les mécanismes impliqués dans la morphogénèse des ovocoques. En effet, pour que le modèle 1 soit compatible avec nos observations (remodelage du PG apparent dès l'étape I), il faudrait qu'il existe deux machineries de remodelage, l'une associée à l'élongasome, l'autre au divisome. Dans notre modèle, une seule machinerie, le remodelasome, permettrait de remodeler le PG synthétisé par le divisome.

Notre modèle réunifie également les différentes observations faites sur la synthèse du septum dans trois espèces majeures d'ovocoques : *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, et *Lactococcus lactis*. En effet, il a été montré que la dimension radiale du septum chez *S. pneumoniae* et de *L. lactis* reste approximativement constante (~ 100 nm) au cours de la division et que le septum ne se ferme qu'à une étape très tardive (lorsque le septum a un diamètre d'environ 200 nm) (Wheeler et al., 2011). En revanche, chez *E. faecalis*, la dimension radiale du septum augmente au fur et à mesure de la division, et le septum se ferme très tôt (lorsque le septum a un diamètre d'environ 500 nm). De plus, il a été montré dans la même étude que la synthèse de PG pré-septal allongeait la cellule de 300 nm chez *S. pneumoniae* et *E. faecalis*, contre 600 nm chez *L. lactis*. Etant donné que ces trois bactéries sont phylogénétiquement très proches les unes des autres et qu'elles ont une morphologie similaire, il est peu probable qu'elles aient des systèmes de régulation des complexes morphogénétiques différents, ce qui serait nécessaire avec le modèle 1 de division. Dans notre modèle, nous proposons que de légères différences dans l'activité du divisome et du remodelasome existent entre les trois espèces, et mènent aux différences observées dans la progression du septum et dans la morphologie de la cellule (*L. lactis* est légèrement plus allongé que *S. pneumoniae* qui est lui-même légèrement plus allongé qu'*E. faecalis*).

Il est intéressant de constater que la synthèse de PG pré-septal n'est pas limitée aux ovocoques. En effet les bacilles tels que *B. subtilis* ou *E. coli*, qui possèdent un élongasome dépendant de MreB, ont une étape d'élongation pré-septale dépendante de FtsZ (Aarsman et al., 2005; Den Blaauwen et al., 2003; Scheffers et al., 2004; Vats et al., 2009). Cette élongation pré-septale semble ne pas avoir d'intérêt pour les bacilles dont l'élongation résulte principalement de l'activité de synthèse

réalisée par le complexe RodA/bPBP/MreB dans la région cylindrique de la cellule. Cependant, en considérant, d'après le modèle 2, qu'il ne s'agit en réalité que de la conséquence du remodelage du septum, il n'est pas étonnant que les bacilles possèdent eux aussi une phase d'élongation pré-septale.

PBP2b et RodA sont toutes deux associées à l'élongasome, soit dans notre modèle au remodelasome, qui inclurait également des hydrolases du PG (Berg et al., 2013; Philippe et al., 2015b). PBP2x est quant à elle associée au divisome, qui dans notre modèle n'inclue pas d'hydrolase du PG. Le fait que l'inactivation de PBP2b par des β -lactamines soit bactériolytique alors que celle de PBP2x soit bactériostatique est donc cohérent avec l'existence d'un remodelasome et d'un divisome : il est plus délétère pour la cellule d'inhiber une synthase dans un complexe qui inclue également une activité d'hydrolyse du PG (l'hydrolyse n'est alors plus compensée par l'activité de synthèse) que dans un complexe qui ne possède qu'une activité de synthèse (Hakenbeck et al., 1987; Philippe et al., 2015b). L'hypothèse d'un remodelasome qui combinerait des activités d'hydrolyse ménagée du PG septal et de synthèse par PBP2b/RodA est également compatible avec le fait que l'inactivation de la transglycosylase lytique MltG entraîne la perte d'essentialité de PBP2b et RodA (Tsui et al., 2016).

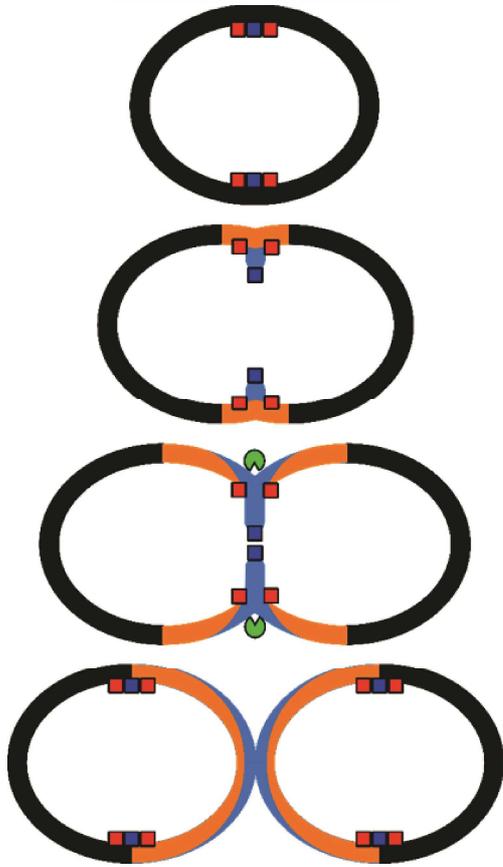
En conclusion, nous proposons ici un nouveau modèle de la morphogenèse chez les ovocoques, qui est cohérent avec un grand nombre d'observations provenant de ma thèse ou de la bibliographie. Le modèle admis précédemment proposait qu'un élongasome synthétise du PG en périphérie du septum, différent voire adjacent au PG septal, qu'un divisome synthétise le PG septal et qu'une machinerie de remodelage permette le clivage du septum. Notre modèle n'est pas radicalement différent mais il propose un mécanisme plus simple, basé sur l'existence de **deux machineries** : le divisome (ne contenant que des synthases du PG) synthétiserait le PG septal (que l'on pourrait illustrer en termes de maçonnerie par le gros œuvre) et le remodelasome (contenant des synthases et des hydrolases du PG) se chargerait du clivage du septum et d'une synthèse de PG qui viendrait renforcer et/ou compléter le PG septal (que l'on pourrait illustrer en termes de maçonnerie par de la sculpture, du modelage et des finitions). Le divisome et le remodelasome seraient actifs tous deux dès le début du cycle cellulaire et la septation (l'apparition d'un septum) ne résulterait pas de l'activation du

divisome mais d'une accélération de la vitesse de progression de ce dernier vers le centre du plan de division. Ce nouveau modèle permettra peut-être d'ouvrir des perspectives et de nouveaux axes de réflexions qui contribueront à améliorer notre compréhension de la morphogénèse bactérienne.

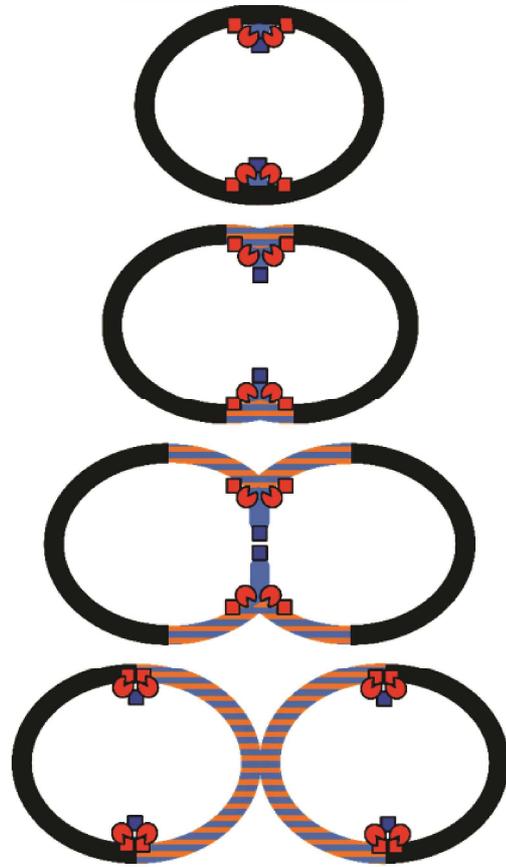
Figure 30 : Modèles de morphogénèse des ovocoques (a) Le modèle 1 correspond au modèle couramment admis dans la littérature. Ce schéma est tiré de Philippe et al. , 2015. Dans ce modèle, l'élongasome (Carrés rouges) synthétise le PG périphérique (Paroi orange), puis le divisome (Carrés bleus) synthétise le PG septal (paroi bleue). Des hydrolases du PG (Pac-man vert) clivent le septum. Dans le modèle 2, le divisome (carrés bleus) synthétise du PG septal (paroi bleue) qui est partiellement dégradé par des hydrolases du PG (Pac-man rouges) appartenant au remodelasome. Afin de solidifier le PG septal partiellement dégradé, du PG est également inséré par des synthases (carrés rouges) au sein du remodelasome. Après l'étape pré-septale, la vitesse de progression du divisome vers le point de fermeture du septum accélère, ce qui a pour effet l'apparition du septum. (b) et (c) Détails du modèle 2 de morphogénèse des ovocoques. Dans ce modèle, lorsque le divisome et le remodelasome ont une vitesse de progression identique (en b) , le septum ne peut pas émerger. Il s'agit d'une situation de type « tapis-roulant ». A l'inverse, si le divisome progresse plus rapidement que le remodelasome (en c), le surplus de PG septal

a

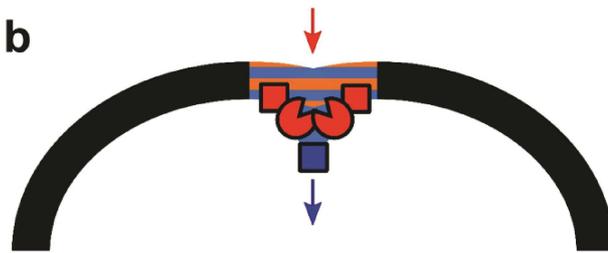
Modèle 1



Modèle 2

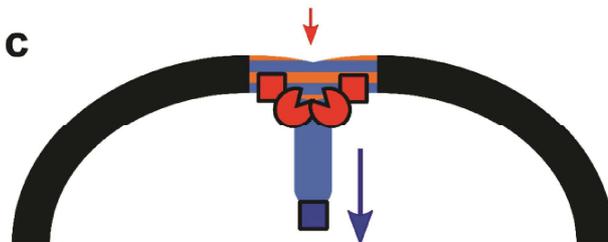


b



$V1 = V2$: pas de septum

c



$V1 < V2$: progression du septum

Matériel et méthodes

Souches bactériennes

Les souches et oligonucléotides utilisés dans ces travaux sont présentés dans la table 1. Le fragment d'ADN *ezrA-spdendra2* a été construit par la méthode de PCR reconstitutive ou « overlap extension PCR » (Bryksin and Matsumura, 2010; Shuldiner et al., 1990). En résumé, plusieurs fragments d'ADN possédant des séquences identiques au niveau de leurs extrémités 3' ou 5' sont combinés par PCR. Le remplacement allélique du gène *ezrA* par la construction *ezrA-spdendra2* a été effectué par la méthode Janus (Sung et al., 2001). En résumé, nous avons utilisé une procédure en deux étapes basée sur l'insertion, puis la délétion, d'une cassette *kan-rpsL* bicistronique appelée Janus dans la région du gène *ezrA*. Cette méthode permet de muter le gène ciblé sans présence finale d'une cassette de résistance à un antibiotique, afin de prévenir les effets polaires sur l'expression des gènes voisins.

Conditions de croissance, milieux et transformation

Les cultures liquides des souches de *S. pneumoniae* ont été effectuées à 37°C, dans le milieu C supplémenté avec 0.5% d'extrait de levure (CY) (Lacks and Hotchkiss, 1960) ou en milieu Todd-Hewitt (TH ; BD sciences).

Pour la transformation du pneumocoque, un minimum de 250 ng d'ADN ont été ajoutés aux cellules incubées en présence du peptide de stimulation de la compétence 1 (CSP1) dans du TH supplémenté avec 1 mM de CaCl₂. Les cellules ont été cultivées pendant 2 heures à 37°C en absence d'antibiotique de sélection, et les transformants ont été sélectionnés sur des boîtes de pétri contenant du milieu « Columbia blood agar » (BD sciences) supplémenté avec 4% de sang défibriné de cheval, et avec l'antibiotique approprié (200 µg/ml de streptomycine ou 250 µg/ml de kanamycine).

Toutes les cultures destinées à une observation en microscopie optique ont été cultivées dans du milieu CY.

Souches, oligonucléotides	Génotype ou description	Référence
R800	R6, <i>rpsL::rpsL1</i> , Str ^R	Souche de laboratoire
<i>ΔstkP</i>	R800, <i>ΔstkP</i> , Str ^R	Fleurie et al., 2012
<i>ΔgpsB</i>	R800, <i>ΔgpsB</i> , Str ^R	Fleurie et al., 2014
<i>ΔdivIVA</i>	R800, <i>ΔdivIVA</i> , Str ^R	Fleurie et al., 2014
<i>ftsZ-spdendra2</i>	R800, <i>ftsZ::ftsZ-spdendra2</i> , Str ^R	Jacq et al., 2015
<i>eza-spdendra2</i>	R800, <i>eza::eza-spdendra2</i> , Str ^R	Cette étude
FORoCA6	amorce pour l'amplification de la région en 5' du gène <i>eza</i> TATCGTAAACTAATTGATGC	Cette étude
REVoCA7	amorce pour l'amplification de la région en 5' du gène <i>eza</i> CACATTATCCATTAAAAATCAAACGGTTA AAAACGAATCGTTTC	Cette étude
FORoCA8	amorce pour l'amplification de la région en 3' du gène <i>eza</i> GGAAAGGGGCCAGGTCTCTTAAAAGAAAAAGATTTTATTGTGTG	Cette étude
REVoCA9	amorce pour l'amplification de la région en 3' du gène <i>eza</i> CCTAACTCCTTTTTATAAGCC	Cette étude
P1	amorce pour l'amplification de la cassette Janus CCGTTTGATTTTTAATGGATAATG	Sung et al., 2001
P2	amorce pour l'amplification de la cassette Janus AGAGACCTGGGCCCTTTCC	Sung et al., 2001

Table 1 : Souches et oligonucléotides utilisés dans cette étude. Les nucléotides en gras représentent la partie de l'amorce qui s'hybride à la cassette Janus.

Préparation des échantillons observés en PALM

Dix millilitres de culture sont inoculés avec 50 µl d'un aliquot de stock glycérol de la souche congelée et conservée à -80 °C. Les cellules sont cultivées dans du milieu CY à 37 °C (dans un incubateur statique à CO₂) jusqu'à ce qu'elles atteignent un état de régime permanent : cet état est atteint après deux cycles de dilution des cultures dans du milieu CY (dilution au 20^{ème}) lorsque la densité optique à 600 nm (DO_{600nm})

atteint la valeur de 0.3. Cette méthode de culture permet que la totalité des bactéries soit en état de division active, également appelé « régime permanent ».

Les cellules sont ensuite directement fixées dans le milieu de culture par ajout de 2% de paraformaldéhyde (EM grade, Electron Microscopy Sciences) et incubation à 20°C pendant 1 heure. Les cellules sont lavées par trois cycles incluant une centrifugation à 4 000 × g pendant 2 min (température ambiante) et resuspension des culots dans 50 µl de PBS 1X.

Trois microlitres de suspension de cellules sont enfin transférés sur une lamelle de microscopie propre (les lamelles sont lavées par un traitement de 40 minutes dans un four à ozone). La lamelle est alors recouverte d'une seconde lamelle propre de taille inférieure. Un poids important est appliqué sur l'ensemble par le plat de la main afin de ne laisser qu'un espace suffisant pour observer les bactéries dans le même plan. Le montage est enfin scellé par l'application d'un vernis à ongles transparent.

Marquage en deux étapes du peptidoglycane et préparation des échantillons pour observation en dSTORM

Dix millilitres de culture sont inoculés avec 50 µl d'un stock glycérol de la souche congelée et conservée à -80°C. Les cellules sont cultivées dans du milieu CY à 37°C (dans un incubateur statique à CO₂) jusqu'à ce qu'elles atteignent un état de régime permanent.

Les cellules sont alors centrifugées pendant 2 min à 4 000 × g et à température ambiante. Le culot est resuspendu dans 600 µl de milieu CY préchauffé à 37°C contenant le dérivé de la D-Alanine (zDA, zDADA ou DADAz) à une concentration finale de 250 µM. Les cellules sont incubées dans un bain-marie à 37°C pendant la période de marquage (5 min la plupart du temps).

A l'issue de la période de marquage (période de « pulse »), du paraformaldéhyde est ajouté à une concentration finale de 2%, et le tout est placé sur la glace durant la nuit. Le lendemain, les cellules sont lavées deux fois par centrifugation à 4 000 × g pendant 2 min (température ambiante) et resuspension des culots dans 1 ml de PBS 1X.

Par la suite, la réaction de chimie click est effectuée par incubation des cellules dans 150 ml de PBS 1X contenant du DIBO-AF647 (Life technologies) à une concentration de 25 μM . Après 1 heure d'incubation à température ambiante, les cellules sont lavées au moins deux fois par centrifugation à $4\,000 \times g$ pendant 2 min (température ambiante) et resuspension des culots dans 1 ml de PBS 1X.

Le dernier lavage est effectué avec 1 ml de tampon pré-dSTORM (150 mM Tris-HCl pH8, 50 mM NaCl, 10 % glucose). Après centrifugation, le surnageant est jeté et les cellules sont resuspendues dans 10 μl de tampon dSTORM (150 mM Tris-HCl pH8, 50 mM NaCl, 10 % glucose, 200 mM mercaptoéthanolamine (MEA), (solution mère à 1M congelée), 1 mg/ml de glucose oxydase, et 80 $\mu\text{g/ml}$ de catalase. La glucose oxydase et la catalase sont ajoutées à partir d'une solution mère congelée contenant 10 mg/ml de glucose oxydase et 0.8 mg/ml de catalase.

En considérant que le tampon dSTORM est dilué environ au demi par le tampon pré-dSTORM présent de manière résiduelle avec le culot de bactéries, la composition du tampon final est la suivante : 150 mM Tris-HCl pH8, 50 mM NaCl, 10 % glucose, 100 mM mercaptoéthanolamine (MEA), 0.5 mg/ml de glucose oxydase, et 40 $\mu\text{g/ml}$ de catalase

Les cellules resuspendues dans le tampon de dSTORM sont montées entre deux lamelles de la même manière que précédemment.

Microscope PALM/dSTORM et acquisition des données

Les images de PALM et de dSTORM ont été acquises à 20°C avec un microscope PALM/dSTORM construit par nos collaborateurs de l'équipe PIXEL de l'IBS, basé sur un microscope Olympus IX81 (Olympus, Japon) et équipé avec des lasers solides pompés par diode à 405 nm, 488 nm, 561 nm, et 643 nm.

L'illumination en champ large a été effectuée par la focalisation du faisceau laser polarisé circulairement dans le plan focal arrière d'un objectif 100X apochromatique à immersion à huile avec une ouverture numérique (NA) de 1.49 (Olympus).

L'intensité et la séquence temporelle de l'illumination laser de l'échantillon est réglée par un filtre ajustable acousto-optique (AOTF ; Quanta Tech). Les images

de fluorescence ont été acquises avec une caméra CCD (Photometrics) contrôlée par le logiciel Metamorph (Molecular Devices).

Pour la collection des données PALM, la photoconversion de spDendra2 a été effectuée à l'aide d'un laser de longueur d'onde 405 nm, en augmentant sa puissance de 1% à 100% (valeur maximale de 14.4 W/cm²), afin de contrebalancer la diminution du nombre de protéines non photo-converties disponibles. L'excitation de la forme photo-convertie de spDendra2 a été effectuée à l'aide d'un laser de longueur d'onde 561 nm, avec une puissance de 8.8 kW/cm² au centre du faisceau. Les images ont été collectées jusqu'à atteindre un plateau bas dans la fréquence des signaux fluorescents détectés, signe que la majorité des protéines ont été photo-converties et imagées. Afin de minimiser l'autofluorescence induite par le laser UV, les données ont été collectées en utilisant un schéma d'illumination alterné consistant en une période d'illumination à 405 nm de 21 ms pour la photo-conversion, suivie d'une période d'illumination à 561 nm de 30 ms pour l'excitation de la fluorescence.

Pour la collection des données dSTORM, l'échantillon immergé dans le tampon dSTORM a été illuminé simultanément à l'aide d'un laser de longueur d'onde 405 nm, en augmentant sa puissance de 1% à 100% (valeur maximale de 14.4 W/cm²), et à l'aide d'un laser de longueur d'onde 643 nm d'une puissance maximale de 21 kW/cm².

Les images en microscopie conventionnelle des échantillons pour le dSTORM ont été prises sur le microscope PALM/dSTORM, avant l'acquisition dSTORM, avec une illumination faible par le laser à 643 nm (0.01 % de la puissance maximale).

Analyse des données et reconstruction des images super-résolues

Tout le processus de reconstruction des données a été effectué avec le plugin ThunderSTORM (Ovesný et al., 2014) pour le logiciel ImageJ. En bref, le logiciel localise dans un premier temps les molécules fluorescentes en modélisant leur signal comme une courbe gaussienne, la molécule étant localisée en son centre. La localisation de toutes les molécules observées dans chacune des milliers d'image acquises sont regroupées dans une matrice. Les données sont ensuite affinées par la correction du scintillement inhérent à la méthode. Enfin, la dérive de l'échantillon

durant l'acquisition est corrigée à l'aide de la référence fournie par la présence des billes fluorescentes (nano-billes d'or ou TetraSpec). Dans un dernier temps, une image finale est reconstituée en attribuant à chaque localisation un profil gaussien spécifique.

Les moyennes de précision de localisation obtenues ont été calculées par le logiciel à partir de la déviation standard de la PSF (Point spread function) et du nombre de photons émis par les fluorophores.

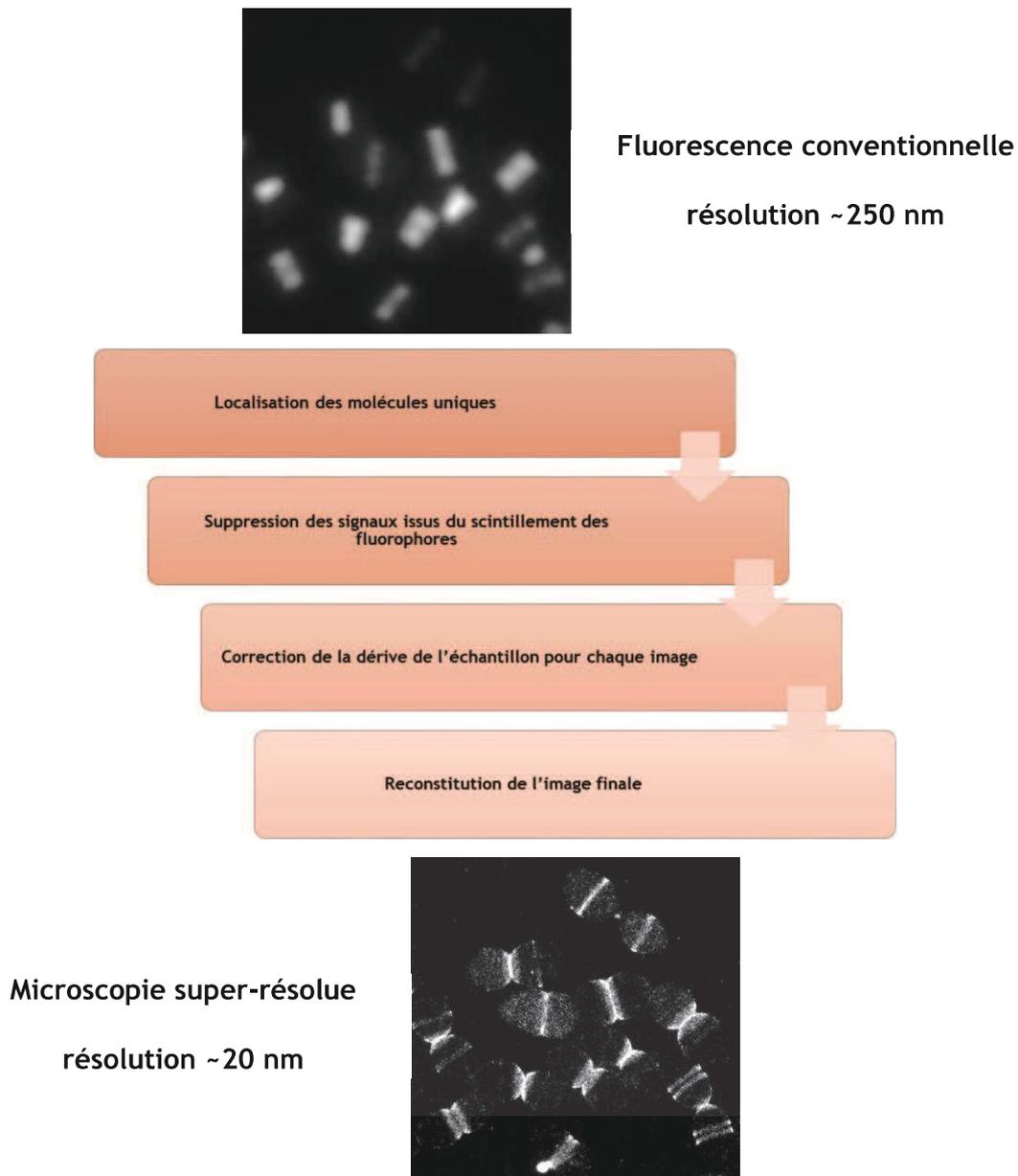


Figure 31 : Processus général pour l'acquisition d'une image en microscopie de localisation de molécule unique. Les deux images correspondent au détail d'un champ de microscopie de cellules de la souche de *S. pneumoniae* R800, dont le PG nouvellement synthétisé est rendu fluorescent par la méthode du marquage en deux étapes zDADA puis DIBO-AlexaFluor647. L'image du haut correspond à une acquisition de microscopie conventionnelle, et l'image du bas correspond à une acquisition de dSTORM.

La résolution spatiale des images reconstruites a été estimée d'après la résolution de Nyquist à partir du nombre de molécules (N) présentes dans l'aire de la surface marquée (A), et donnée par la formule $r = \frac{2}{\sqrt{N/A}}$ (Shim et al., 2012).

Les zones annulaires de synthèse du PG ayant été observées en grande majorité en projection 2D le long de l'axe radial de la cellule, les surfaces marquées ont été assimilées à des rectangles dont la longueur est égale au diamètre de la zone annulaire de synthèse du PG et la largeur est égale à l'épaisseur axiale de la zone de synthèse.

Analyse de la géométrie des zones de synthèse du peptidoglycane et comptage du nombre de molécules

A l'aide du plugin ThunderSTORM, des zones englobant chacun des sites de synthèse ont été sélectionnées manuellement et leur profil d'intensité de fluorescence a été projeté perpendiculairement ou parallèlement au plus grand axe de l'anneau (Fig. 32).

A partir de ces projections, les dimensions de l'anneau sont mesurées. Le diamètre de la zone annulaire de synthèse a été déterminé comme étant la distance entre les deux minimums d'intensité le long du plus grand axe de l'anneau. Pour la mesure de l'épaisseur axiale de la zone de synthèse, la projection du signal fluorescent parallèlement au plus grand axe de l'anneau est estimée comme étant proche d'une distribution gaussienne. L'épaisseur axiale de la zone de synthèse correspond à la largeur à mi-hauteur (FWHM) de cette fonction gaussienne.

Afin de tester la signification statistique des données, les « p values » ont été obtenues par un test de Mann-Whitney en utilisant le logiciel R.

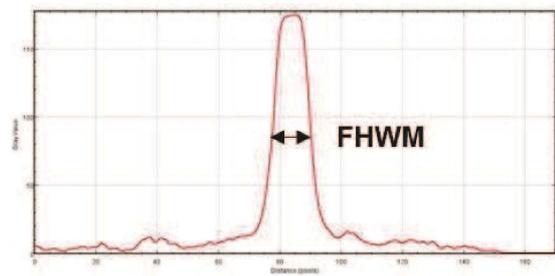
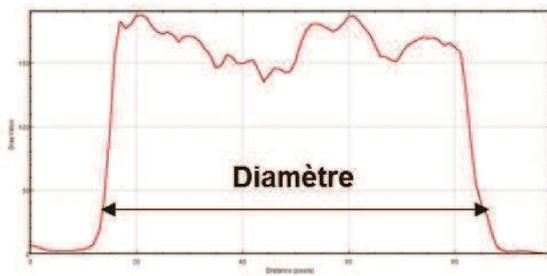
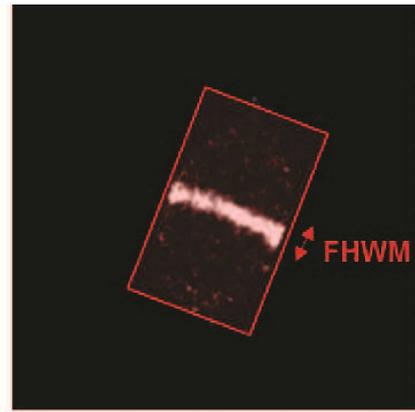
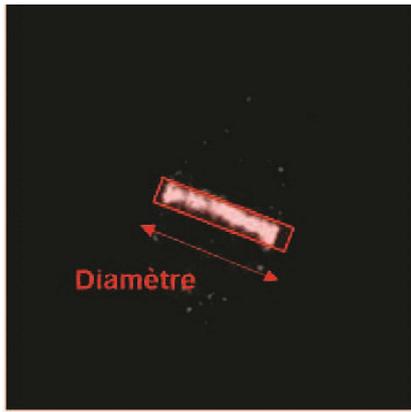


Figure 32 : Mesure des dimensions de la zone annulaire de synthèse du PG. Haut : image reconstruite en dSTORM et sélection des zones analysées sous ImageJ (rouge) pour déterminer le diamètre (image de gauche) et l'épaisseur de la région de synthèse (image de droite). Bas : projection de l'intensité de fluorescence des zones rouges sélectionnées, perpendiculairement (image de gauche) ou parallèlement (image de droite) au grand axe de l'anneau. FWHM : largeur à mi-hauteur

Annexe 1 : The cell wall hydrolase Pmp23 is important for assembly and stability of the division ring in *Streptococcus pneumoniae*.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN The cell wall hydrolase Pmp23 is important for assembly and stability of the division ring in *Streptococcus pneumoniae*

Maxime Jacq^{1,6}, Christopher Arthaud¹, Sylvie Manuse^{2,7}, Chryslène Mercy², Laure Bellard¹, Katharina Peters³, Benoit Gallet¹, Jennifer Galindo¹, Thierry Doan⁴, Waldemar Vollmer³, Yves V. Brun⁵, Michael S. VanNieuwenhze⁵, Anne Marie Di Guilmi¹, Thierry Vernet¹, Christophe Grangeasse² & Cecile Morlot¹

Bacterial division is intimately linked to synthesis and remodeling of the peptidoglycan, a cage-like polymer that surrounds the bacterial cell, providing shape and mechanical resistance. The bacterial division machinery, which is scaffolded by the cytoskeleton protein FtsZ, includes proteins with enzymatic, structural or regulatory functions. These proteins establish a complex network of transient functional and/or physical interactions which preserve cell shape and cell integrity. Cell wall hydrolases required for peptidoglycan remodeling are major contributors to this mechanism. Consistent with this, their deletion or depletion often results in morphological and/or division defects. However, the exact function of most of them remains elusive. In this work, we show that the putative lysozyme activity of the cell wall hydrolase Pmp23 is important for proper morphology and cell division in the opportunistic human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. Our data indicate that active Pmp23 is required for proper localization of the Z-ring and the FtsZ-positioning protein MapZ. In addition, Pmp23 localizes to the division site and interacts directly with the essential peptidoglycan synthase PBP2x. Altogether, our data reveal a new regulatory function for peptidoglycan hydrolases.

Bacterial division results from the combination of membrane constriction with expansion and remodeling of the cell wall. The main constituent of the cell wall is the peptidoglycan (PG), a stress-bearing mesh made of glycan chains crosslinked by peptides¹. PG expansion and remodeling requires three major classes of enzymes: the SEDS (Shape, elongation, division and sporulation) polymerases RodA and FtsW, which elongate the glycan chains, the penicillin-binding proteins (PBPs), which catalyze the polymerization of the glycan chains and the crosslinkage of the peptides, and the cell wall hydrolases (CWHs), which carry various cell wall degrading and remodeling activities^{2–5}. The enzymatic activity of many CWHs is known but for most of them, their function in bacterial morphogenesis and division remains unclear. Known CWH functions include regulation of PG precursor availability, PG maturation, septum splitting, cell separation and autolysis^{4,5}. It has also been proposed that some CWHs cooperate with synthases to cleave within the existing PG polymer to allow insertion of new material, but direct evidence for such mechanism is still lacking⁶. While the role of the CWHs involved in cell separation and autolysis has been rather well studied, little is known regarding the cellular function of the other ones, especially those involved in PG maturation, which includes the regulation of the length of the glycan and peptide chains, as well as the degree of crosslinking.

¹Institut de Biologie Structurale (IBS), University Grenoble Alpes, CEA, CNRS, 38000, Grenoble, France. ²Molecular Microbiology and Structural Biochemistry (MMSB), CNRS, University Lyon 1, UMR 5086, Lyon, 69007, France. ³Centre for Bacterial Cell Biology, Institute for Cell and Molecular Biosciences, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, NE2 4AX, UK. ⁴Laboratoire de Chimie Bactérienne, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, University Aix-Marseille, CNRS, UMR7283, 13009, Marseille, France. ⁵Indiana University, Departments of Biology and Chemistry, Bloomington, IN, 47405, USA. ⁶Present address: Indiana University, Department of Biology, Bloomington, IN, 47405, USA. ⁷Present address: Northeastern University, Department of Biology, Boston, MA, 02115, USA. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.G. (email: christophe.grangeasse@ibcp.fr) or C.M. (email: cecile.morlot@ibs.fr)

During the bacterial division cycle, cell wall synthesis and remodeling are coordinated with membrane constriction, led by the tubulin homologue FtsZ. This coordination relies on a complex network of transient functional and physical interactions, yet to be fully identified and characterized, between SEDS proteins, PBPs, CWHs, FtsZ and other proteins of the divisome with structural or regulatory functions. The tubulin-homologue FtsZ, which polymerizes at midcell into a ring-like structure called the Z-ring⁷, has a major role in this coordination mechanism since it recruits directly or indirectly various division proteins to the division site, including some of the PBPs and CWHs^{8–11}. Assembly and stability of the Z-ring is thus essential for proper division. In the opportunistic human pathogen *Streptococcus pneumoniae*, the MapZ protein (also named LocZ) regulates Z-ring positioning, orientation, stability and constriction at midcell through direct interaction with FtsZ^{12–14}. In addition, MapZ is a substrate of the Ser/Thr kinase StkP and both phosphorylated and non-phosphorylated forms of MapZ are required for proper Z-ring formation and dynamics¹². Other pneumococcal proteins with a key regulatory function in cell division are CWHs since impairment of their activity or localization leads to severe shape and division defects^{15–20}. However, their precise regulatory function in these processes remains unclear. Investigating this question in model organisms like *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* is not an easy task because these bacteria possess several tens of CWHs with redundant functions^{4,5}. By contrast, the ovococcus *S. pneumoniae* does not only possess a small number of CWHs (12 pneumococcal CWHs have been identified so far), but they also appear to have non-redundant functions since single deletions are sufficient to observe shape and division defects^{15–20}. Among the CWHs involved in pneumococcal growth and division, the *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase/endopeptidase PcsB is required for septum splitting^{17,21}, the putative lytic transglycosylase MltG is required for peripheral cell wall synthesis²⁰, the D,D-carboxypeptidase PBP3 (DacA) and the L,D-carboxypeptidase DacB limit the amount of crosslinking by trimming the pentapeptide substrates of the PBP synthases^{16,19,22–24}, and the endo- β -*N*-acetylglucosaminidase LytB is responsible for the physical and final separation of daughter cells²⁵. A sixth CWH, called Pmp23 (*spr0930* gene), is involved in *S. pneumoniae* cell division and morphogenesis. Pmp23, which carries a glycoside hydrolase domain that is conserved in many Gram-positive bacteria (including various human pathogens), was originally proposed to behave as a putative *N*-acetylmuramidase (lytic transglycosylase or lysozyme) in *S. pneumoniae*^{18,26}. Its deletion results in enlarged cells and misplaced septa but its exact function in *S. pneumoniae* morphogenesis and division has remained mysterious so far^{18,19,27}. In this work, we investigated the role of Pmp23 in the localization and activity of *S. pneumoniae* division and cell wall synthesis machinery. Using 3D homology modeling, genetics, fluorescence microscopy and protein-protein interaction experiments, we provide data supporting the idea that Pmp23 is a bacterial lysozyme involved in the stability of the division machinery, revealing a new connection between cell wall metabolism and cell division.

Results

Pmp23 displays homology with bacterial lysozymes. In a previous work, Pmp23 was proposed to belong to the *N*-acetylmuramidase family^{18,26}, which includes lytic transglycosylases (LTs) and goose(G)-type lysozymes. Lysozymes and LTs are both sugar hydrolases that cleave the β -1,4 MurNAc-GlcNAc glycosidic bond (*N*-acetylmuramidase activity), but LTs use the C-6 hydroxyl of MurNAc instead of water as a nucleophile in the cleavage reaction, generating a product ending with 1,6-anhydro MurNAc. The enzymatic activity of G-type lysozymes and LTs all require a Glu residue that is conserved in Pmp23 (E61) but near this catalytic position, G-type lysozymes carry an Asn and a second negatively charged catalytic residue that are not conserved in LTs^{28,29} and are present in Pmp23 (N119 and E74), suggesting that Pmp23 might be a G-type lysozyme (Fig. S1). However, the low sequence identity of Pmp23 with the G-type lysozyme (10% over 186 residues) prompted us to revisit this analysis. A search for structural homologues in the Protein Data Bank through the NCBI server (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) identified the bacterial lysozyme domain (bLysG) of CwlT from *Clostridium difficile* (CwlT_{Cd}) and *Staphylococcus aureus* (CwlT_{sa}), which display 32% and 29% identity with Pmp23, respectively (Fig. 1a). We then performed 3D homology modeling through the Swiss Model server (<http://swissmodel.expasy.org/>), using the bLysG domain of CwlT_{Cd} (PDB code 4HPE) and CwlT_{sa} (PDB code 4FDY) as templates²⁹ (Figs 1b and S1b,c). Both Pmp23_{4HPE} and Pmp23_{4FDY} models were predicted with high-confidence factors (mean value \pm SD, 0.7 ± 0.1 for Pmp23_{4HPE} and Pmp23_{4FDY}) and most exclusively contain α -helices that form two N- and C-terminal lobes delimiting the putative active site groove, which traverses one face of the protein (Figs 1b and S1b,c). Within the active site, the catalytic Glu and Asp residues of bLysG domains²⁸ (E81 and D88 in CwlT_{Cd}, E83 and D90 in CwlT_{sa}) are conserved in Pmp23 and correspond to positions E61 and D68 (Fig. 1). In addition, the DVMQSSSES sequence motif, which is conserved in bLysG domains but absent in LTs and G-type lysozymes and defines the bLysG family^{28,29}, is strictly conserved in Pmp23 (D₆₈VMQSSSES) (Figs 1 and S1). Pmp23 thus possesses all the specific features of a bacterial lysozyme.

Deletion of *pmp23* and inactivation of its predicted bacterial lysozyme activity cause morphological defects. Deletion of the *pmp23* gene using an antibiotic insertion cassette was previously shown to affect cell morphogenesis and division in *S. pneumoniae* R6 or D39^{18,19,27}. To verify that the phenotypes of these strains were not due to a polar effect on the expression of neighboring genes, we constructed a markerless *pmp23* deletion strain of *S. pneumoniae* R6 (Δ *pmp23*). Median values of $1.65 \pm 0.22 \mu\text{m}$ ($n = 370$) and $1.86 \pm 0.29 \mu\text{m}$ ($n = 643$) were obtained for the cell length of wild-type and Δ *pmp23* cells, respectively (Fig. 2a). Median values of $0.70 \pm 0.03 \mu\text{m}$ and $0.80 \pm 0.05 \mu\text{m}$ were obtained for the cell width of wild-type and Δ *pmp23* cells, respectively. Statistical analyses of the length and width distributions indicated that the observed differences between the two strains are significant (U test of Mann-Whitney, p -values < 0.0001 for all analyses, see Fig. 2a). In the absence of Pmp23, cells are thus slightly but significantly longer and larger than those of the wild-type strain. In addition, $\sim 13\%$ of Δ *pmp23* cells had a distorted shape and/or division defects. Analysis of these abnormal cells by electron microscopy revealed the presence of misplaced, aborted and sometimes multiple septa (Figs 2b and S2c). When the *pmp23* deletion strain was complemented with a *3xflag-pmp23* construct, normal cell morphology was

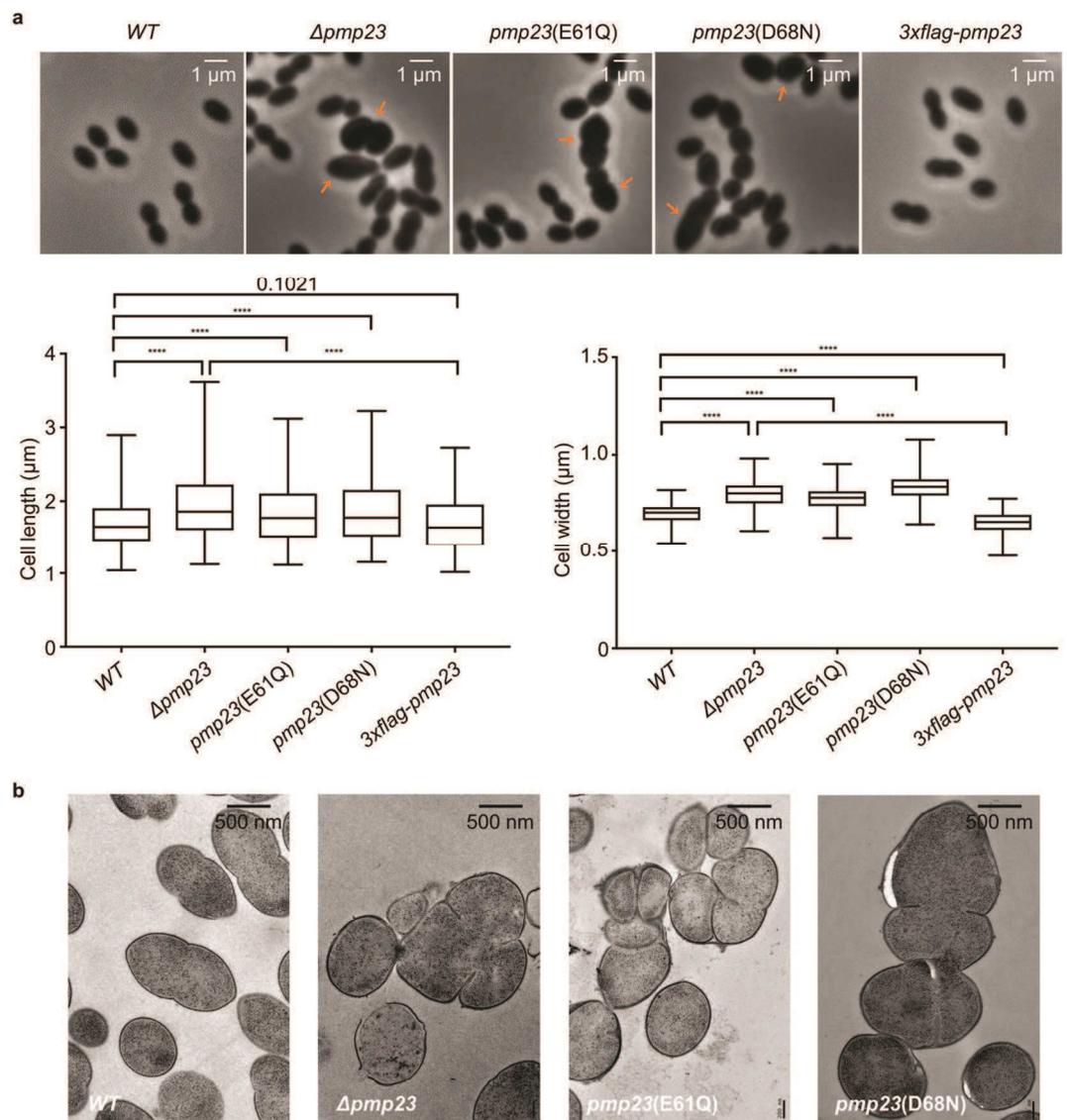


Figure 2. Characterization of wild-type and *pmp23* mutant *S. pneumoniae* cell morphology. **(a)** Phase contrast images of exponentially growing wild-type (WT), $\Delta pmp23$, *pmp23*(E61Q), *pmp23*(D68N) and $\Delta pmp23$ -3xflag-*pmp23* (3xflag-*pmp23*) *S. pneumoniae* cells. Orange arrows indicate cells with a distorted shape and/or division defects. Distributions of cell length and width among the cell population in wild-type (n = 370), $\Delta pmp23$ (n = 643), *pmp23*(E61Q) (n = 740), *pmp23*(D68N) (n = 599) and $\Delta pmp23$ -3xflag-*pmp23* (n = 590) strains are represented with box plots showing the interquartile range (25th and 75th percentile), the median value and whiskers for minimum and maximum values. P-values from the U test of Mann-Whitney are indicated with an exact number when no significant difference is observed (p-value > 0.05) or with an asterisk when the observed differences are statistically significant (p-value < 0.05). Quadruple asterisks indicate p-values < 0.0001. **(b)** Electron microscopy images of thin sections of wild-type, $\Delta pmp23$, *pmp23*(E61Q) and *pmp23*(D68N) *S. pneumoniae* cells.

almost completely restored, with only 1% of cells being misshaped (median cell length value of $1.64 \pm 0.27 \mu\text{m}$, p-value = 0.1021; median cell width value of $0.66 \pm 0.04 \mu\text{m}$, p-value < 0.0001, when compared with the wild-type strain), suggesting that the shape and division defects of the $\Delta pmp23$ cells are likely due to the absence of Pmp23 (Fig. 2a).

To reconstitute Pmp23 hydrolytic activity *in vitro*, full-length Pmp23 fused to the Glutathione S-Transferase (GST-Pmp23) was purified and solubilized with the non-ionic detergent DDM, and incubated overnight at 37 °C in the presence of purified sacculi from wild-type and $\Delta pmp23$ pneumococcal strains (see the *Methods* section). The use of sacculi from the $\Delta pmp23$ strain was meant to increase the proportion of specific Pmp23 substrate in the purified sacculi. Despite intensive efforts to provide a suitable substrate for Pmp23 (removal of teichoic acids, amidase digestion for removal of peptide chains, and chemical *N*-acetylation), we were unable to detect peptidoglycan degradation products. Accordingly, we sought to determine whether the predicted catalytic residues are

important for Pmp23 function *in vivo* and assess the importance of its putative lysozyme activity for pneumococcal division and morphogenesis.

When mutations E61Q and D68N were introduced in the endogenous *pmp23* gene, the mutant cells displayed shape defects similar to those observed when *pmp23* was deleted (Figs 2 and S2d,e). Indeed, *pmp23*(E61Q) and *pmp23*(D68N) cells were longer than wild-type cells, with median cell length values of $1.77 \pm 0.29 \mu\text{m}$ ($n = 740$) and $1.77 \pm 0.31 \mu\text{m}$ ($n = 599$), respectively. The mutant cells were also larger, with median cell width values of $0.78 \pm 0.04 \mu\text{m}$ for strain *pmp23*(E61Q) and $0.84 \pm 0.04 \mu\text{m}$ for strain *pmp23*(D68N) (Fig. 2a). Statistical analyses of the length and width distributions indicated that the observed differences between the wild-type strain and these two *pmp23* mutant strains are significant (Mann-Whitney p -values < 0.0001 , see Fig. 2a). Finally, ~16% of mutant cells showed division defects (Figs 2b and S2d,e). Importantly, the stability of the mutant proteins and the wild-type control were similar (Fig. S2a).

In conclusion, the overall phenotype of the $\Delta pmp23$ strain suggests that Pmp23 is involved in pneumococcal division and maintenance of cell shape. In addition, the fact that mutations E61Q and D68N phenocopy the *pmp23* deletion supports the idea that Pmp23 is an active lysozyme *in vivo* and that this enzymatic activity is required for proper morphogenesis and division of *S. pneumoniae*.

Inactivation of Pmp23 leads to aberrant localization of FtsZ and the cell wall synthesis machinery.

The morphological and division defects observed with the *pmp23* mutant strains suggest that the localization or activity of the cell wall synthesis machinery is perturbed when Pmp23 is absent or inactive. To test this idea, we first investigated the localization of the major division protein FtsZ, which scaffolds the cell wall synthesis machinery, and the cell wall synthases PBP2x and PBP2b in wild-type, $\Delta pmp23$ and *pmp23*(E61Q) strains. To do so, we expressed previously described *ftsZ-gfp*, *ftsZ-mKate2*, *gfp-pbp2x* and *gfp-pbp2b* fusions at their endogenous locus, under the control of their native promoter¹¹. Importantly, production of these fluorescent fusion proteins did not modify the morphology of the wild-type and the Pmp23 mutant strains. Most $\Delta pmp23$ and *pmp23*(E61Q) cells (88%, $n = 310$ and 85%, $n = 232$, respectively), including those with slightly enlarged dimensions, displayed a wild-type localization of FtsZ, PBP2x and PBP2b, with midcell positioning of ring-like structures, progressive constriction and relocalization at the division sites of the future daughter cells^{11,30–32} (Figs 3 and S3a). However and importantly, all cells with major morphological defects (12% of $\Delta pmp23$ cells; 15% of *pmp23*(E61Q) cells) showed aberrant FtsZ, PBP2x and PBP2b localizations, including annular structures positioned asymmetrically and helix-like structures (Figs 3 and S3a). Aberrant FtsZ structures always co-localized with PBP2x and PBP2b (Fig. 3b,c). Time-lapse experiments performed on *pmp23*(E61Q) cells expressing the *ftsZ-gfp* fusion further showed that asymmetric and helical FtsZ structures can form in cells with or without primary morphological defects (Fig. S4). In addition, helices can either form as soon as FtsZ becomes visible in the daughter cell or arise from single Z-rings that fall apart at some point (Fig. S4). Finally, asymmetric Z-rings and more unexpectedly some of the helical Z-rings are able to constrict, leading to the generation of daughter cells with unequal size (Fig. S4). We verified that FtsZ-GFP levels are not affected in the absence of Pmp23 or in the presence of the Pmp23(E61Q) variant (Fig. S3b), and that helical FtsZ structures were also observed when the native copy of FtsZ was immunolabeled in $\Delta pmp23$ and *pmp23*(E61Q) cells (Fig. S3c). Altogether, these observations suggest that in the absence of Pmp23 or in the presence of an inactive variant, the division and cell wall synthesis machinery is most of the time able to assemble at midcell, but in some cells degenerates into helical structures. Furthermore, helical or asymmetric Z-rings can also form at the onset of the cell cycle and none of these structures constitute dead ends for the division process.

Cell wall synthesis is not affected by Pmp23 inactivation. We next wondered whether the aberrant FtsZ, PBP2x and PBP2b structures observed in $\Delta pmp23$ and *pmp23*(E61Q) cells might arise from altered cell wall synthesis. To test this idea, we monitored cell wall synthesis activity by pulse-chase labeling of new PG using fluorescent D-amino acids (FDAAs)³³. Wild-type, $\Delta pmp23$ and *pmp23*(E61Q) cells expressing an FtsZ-mKate2 fusion were grown shortly in the presence of the BADA label, then the excess dye was washed away and cells were further incubated for 4 min. Most mutant cells (74%, $n = 206$ for $\Delta pmp23$; 70%, $n = 131$ for *pmp23*(E61Q)) displayed a wild-type PG labeling, which appeared as a single or double bands flanking the Z-ring depending on the advancement of the cell cycle (Fig. 4). In $\Delta pmp23$ and *pmp23*(E61Q) cells displaying major morphological defects (21% and 25%, respectively), PG labeling still co-localized with or flanked FtsZ although FtsZ displayed asymmetric or helical structures (Fig. 4). Given that FtsZ always co-localizes with PBPs¹¹ (Fig. 3b,c), these observations suggest that in the absence of Pmp23 or in the presence of an inactive enzyme, the PG synthesis machinery remains active even though it displays abnormal localization. Very surprisingly in a small proportion of $\Delta pmp23$ and *pmp23*(E61Q) cells with no major morphological defects (5% for both strains), the Z-ring and PG labeling were oriented in different planes, indicating that the Z-ring had changed orientation during the chase period (Fig. 4). This unexpected observation further suggests that Pmp23 inactivation causes instability of the orientation of the division and PG synthesis machinery.

MapZ localization is altered in *pmp23* mutant cells. Because cell wall synthesis is still active when Pmp23 is inactive, we wondered whether aberrant FtsZ and PBP structures might arise from impaired localization of MapZ, which is involved in FtsZ positioning, orientation stability and constriction^{12–14}. To investigate this, we expressed a previously described *gfp-mapZ* fusion¹² in wild-type, $\Delta pmp23$ and *pmp23*(E61Q) cells. Wild-type cells displayed the previously described MapZ localization profile: assembly of a single septal ring at the onset of the cell cycle, splitting of this initial ring and progressive separation of the double ring, appearance and constriction of a third ring at midcell (Figs 5 and S5a). While $\Delta pmp23$ and *pmp23*(E61Q) cells with wild-type morphology and dimensions displayed typical MapZ localization profiles, cells with enlarged cell dimensions (14% ($n = 370$) of $\Delta pmp23$ cells and 17% ($n = 361$) of *pmp23*(E61Q) cells) displayed a slight delocalization of

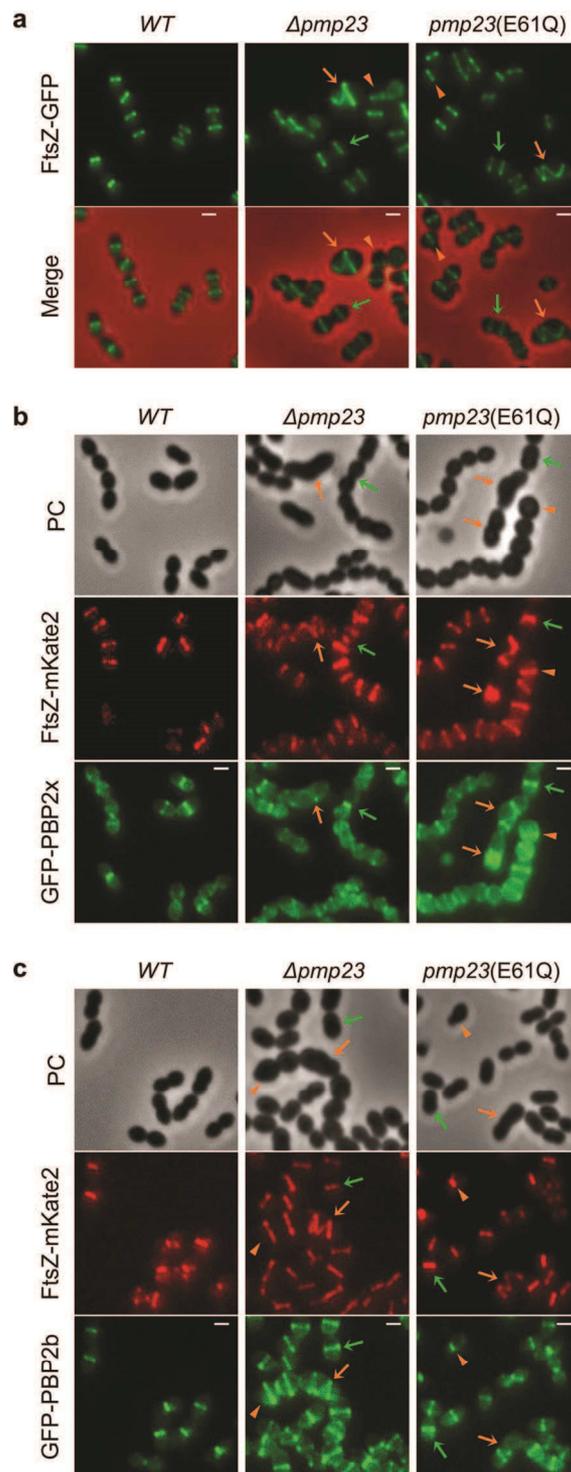


Figure 3. FtsZ and PBP localization in wild-type and *pmp23* mutant cells. **(a)** Live *S. pneumoniae* cells expressing an endogenous copy of *ftsZ-gfp* in wild-type (WT), $\Delta pmp23$ and *pmp23(E61Q)* genetic backgrounds. Examples of cells with wild-type FtsZ localization (green arrows) and distorted cells with asymmetric (orange arrowheads) or helical (orange arrows) FtsZ localization are indicated. GFP fluorescence and merged images (between the GFP and the phase contrast channels) are shown. Scale bars = 1 μm . **(b,c)**. Live *S. pneumoniae* cells expressing the endogenous copy of *ftsZ-gfp* together with either *gfp-pbp2x* **(b)** or *gfp-pbp2b* **(c)** in wild-type (WT), $\Delta pmp23$ and *pmp23(E61Q)* genetic backgrounds. Examples of cells with wild-type FtsZ and PBP localization (green arrows) and distorted cells with asymmetric (orange arrowheads) or helical (orange arrows) FtsZ and PBP localization are indicated. Phase contrast (PC), GFP and mKate2 fluorescence images are shown. Scale bars = 1 μm .

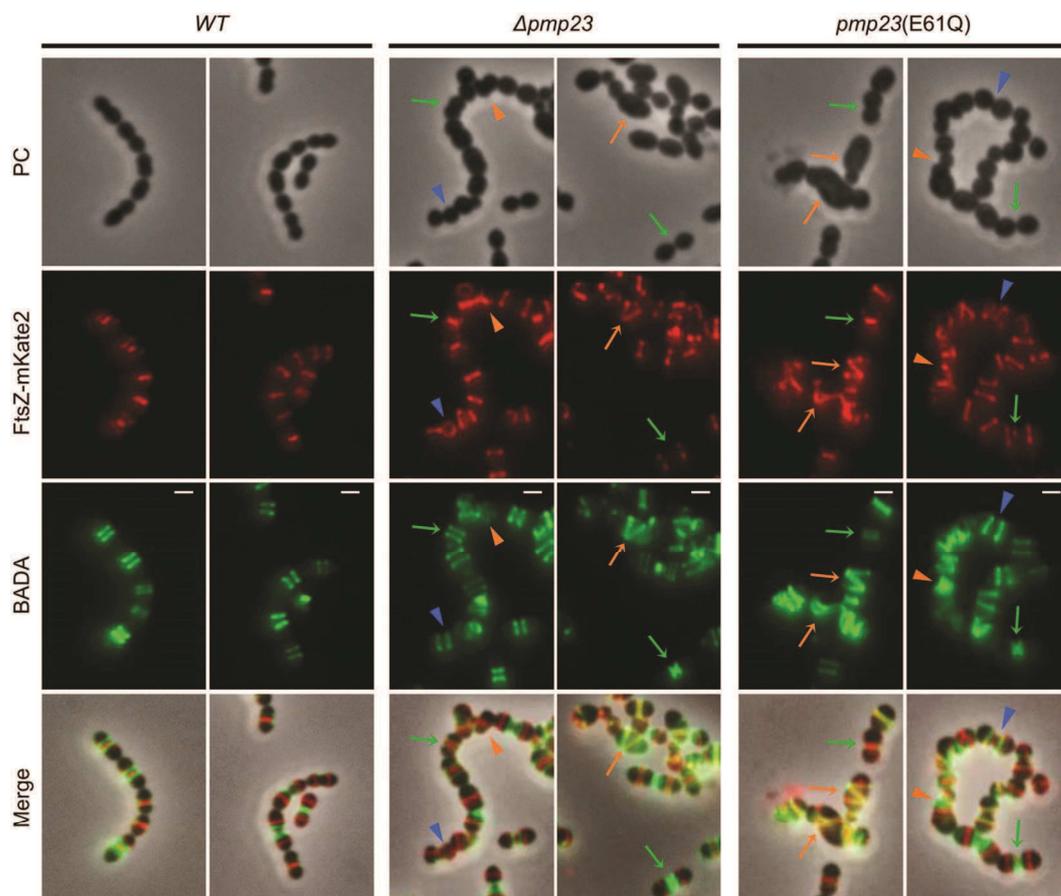


Figure 4. FtsZ localization and PG labeling in wild-type and *pmp23* mutant cells. Pulse-chase labeling of PG with BADA in live *S. pneumoniae* cells expressing an endogenous *ftsZ-mKate2* fusion in wild-type (WT), $\Delta pmp23$ and *pmp23*(E61Q) genetic backgrounds. Examples of cells with wild-type FtsZ localization and PG labeling (green arrows), distorted cells with asymmetric (orange arrowheads) or helical (orange arrows) FtsZ localization and PG labeling are indicated. Blue arrowheads point at cells in which the Z-ring and PG labeling are oriented in different planes. Phase contrast (PC), mKate2 and BADA fluorescence, and merged images are shown. Scale bars = 1 μ m.

MapZ around the cell periphery (Figs 5 and S5a). In addition, all $\Delta pmp23$ and *pmp23*(E61Q) cells with major morphological defects (13% of $\Delta pmp23$ cells and 15% of *pmp23*(E61Q) cells) showed aberrant MapZ structures, including y-shaped, aggregated structures, membrane delocalization or asymmetric positioning of MapZ rings relative to the division site (Figs 5 and S5a). GFP-MapZ levels were not affected by *pmp23* deletion or expression of the inactive variant (Fig. S5b). We thus conclude that Pmp23 is not required for the assembly of the MapZ rings but Pmp23 inactivation leads to partial mislocalization of MapZ.

We next sought to investigate why MapZ localization is affected when Pmp23 is inactive. MapZ localization was previously shown to be driven by its C-terminal PG binding domain³⁴. We purified sacculi from wild-type and $\Delta pmp23$ cells, and analyzed the PG composition (see the *Methods* section). The glycan strands in pneumococcal PG are very long, most of them containing more than 50 disaccharides^{35,36}. The purified sacculi thus had to be treated with mutanolysin before analysis, preventing determination of the average length of the glycan strands. Nevertheless, the analysis of PG composition revealed that the strain lacking *pmp23* had 8% more dimers than monomers, while the wild-type strain had nearly identical proportion of monomers and dimers (Fig. S6). Despite this change in PG composition, MapZ ability to bind the polymer was not significantly affected in pull-down experiments using a recombinant construct of MapZ extracellular domain and purified sacculi from wild-type and $\Delta pmp23$ cells (Fig. S7a). In addition, MapZ phosphorylation did not display significant variation in the $\Delta pmp23$ strain when compared to the wild-type strain (Fig. S7b). Consistent with this observation, the StkP kinase retained septal localization in the $\Delta pmp23$ strain (Fig. S7c).

Pmp23 is enriched at midcell and interacts with PBP2x. Because Pmp23 is predicted to have a glycosidase activity and not a peptidase activity, we hypothesized that the increase in dimer proportion versus monomers in the *pmp23* deletion strain could reflect an aberrant functioning of some peptidoglycan transpeptidases (PBPs), suggesting a potential functional or physical interaction between PBPs and Pmp23. Interestingly, fluorescence microscopy imaging of *S. pneumoniae* cells expressing an ectopic *sfgfp-pmp23* fusion revealed that 75% of the cell population (n = 210) displayed a diffuse cytoplasmic and membrane fluorescence signal while 25%

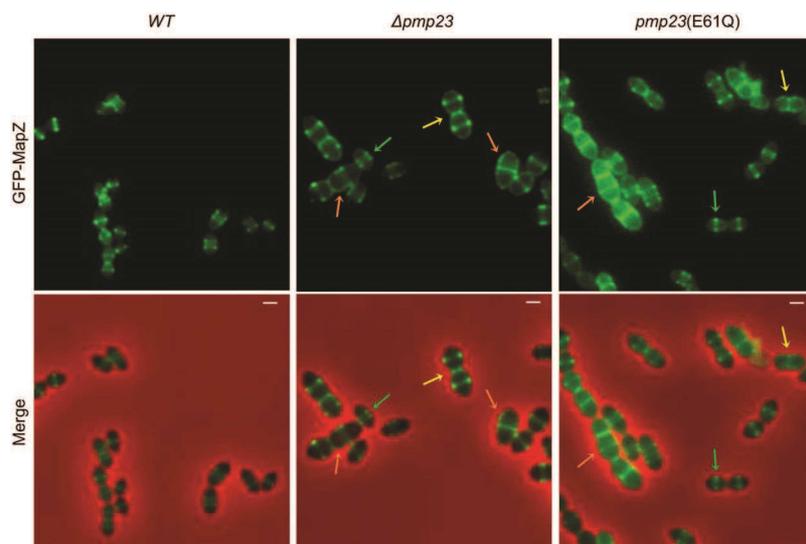


Figure 5. MapZ localization in wild-type and *pmp23* mutant cells. Live *S. pneumoniae* cells expressing an endogenous copy of *gfp-mapZ* in wild-type (*WT*), $\Delta pmp23$ and *pmp23*(E61Q) genetic backgrounds. Examples of cells displaying wild-type morphology and wild-type MapZ localizations (green arrows), enlarged cells with a slight membrane delocalization of MapZ (yellow arrows) and abnormal morphology with aberrant MapZ localizations (orange arrows). GFP fluorescence and merged images (between the GFP and the phase contrast channels) are shown. Scale bars = 1 μ m.

of cells showed enriched fluorescence at the septum (Fig. 6a). Diffuse fluorescence might be due to the fact that about 30% of the sfGFP-Pmp23 fusion protein is cleaved, as observed by the presence of a band corresponding to the sfGFP (~30 kDa) in the anti-GFP Western blot shown in Figure S2a. In addition, about 30% of cells displayed fluorescence foci, possibly reflecting the presence of sfGFP-Pmp23 aggregates. These observations thus indicate that the sfGFP-Pmp23 fusion protein is not fully functional. Nevertheless, the observation of septal fluorescence suggests that in 25% of cells, Pmp23 is ideally located to interact with the PBPs. This observation prompted us to perform immunoprecipitation experiments to identify potential PBP partners of Pmp23. To do so, we used anti-FLAG IgGs on detergent-solubilized membrane fractions from pneumococcal cells expressing the *3xflag-pmp23* fusion. Immunoprecipitated fractions were analyzed by western blot using anti-FLAG IgGs and antibodies specific for each of the five high-molecular weight pneumococcal PBPs (PBP2x, PBP2b, PBP1a, PBP1b and PBP2a)³⁰. Consistent with the idea that Pmp23 and PBP2x interact in the membranes of *S. pneumoniae*, PBP2x was co-immunoprecipitated with 3xFLAG-Pmp23 (Fig. 6b). Importantly, PBP2x was not detected in the immunoprecipitate from an extract derived from a strain that did not express *3xflag-pmp23* (Fig. 6b). To determine whether Pmp23 and PBP2x interact directly *in vitro* and to quantify this interaction, microscale thermophoresis was carried out by titrating the binding of the extracellular domain of PBP2x³¹ to the full-length membrane form of Pmp23. While no binding of Pmp23 was detected with the BSA (bovine serum albumine) control, an affinity constant of $9 \pm 0.8 \mu\text{M}$ was obtained for the Pmp23-PBP2x complex (Fig. 6c). This result indicates that Pmp23 and PBP2x interact directly through their extracellular domain.

Discussion

This study provides evidence that Pmp23 is neither a LT nor a G-type lysozyme as previously predicted^{18,26} but is most likely a bacterial lysozyme required for proper cell morphogenesis and division. In support of this idea, we show that Pmp23 contains the bLysG-specific DVMQSSSES motif and catalytic residues (E61 and D68 in particular), and that mutations E61Q and D68N phenocopy the deletion of the protein.

Indeed when Pmp23 is absent or is mutated on one of the putative catalytic residues E61 or D68, *S. pneumoniae* cells are larger and longer, and a portion of them displays severe morphological and division defects. In the large majority of Pmp23 mutant cells with wild-type morphology or minor morphological defects, FtsZ and the PBPs display a wild-type localization pattern, indicating that the division and PG synthesis machinery is most of the time able to assemble at midcell and constrict throughout the cell cycle. However, cells with severe morphological defects all display abnormal FtsZ localizations, including Z-rings assembled at asymmetric positions and helix-like structures. As expected because the Z-ring serves as a scaffolding platform for the cell wall synthesis machinery, PBP2x and PBP2b always co-localize with these abnormal FtsZ structures. In addition, monitoring of PG synthesis showed that PBPs remain active even though FtsZ is mislocalized. Asymmetric or helical FtsZ structures can appear in newborn daughter cells with no primary morphological defects; they can form *de novo* when the FtsZ relocates to the division sites of the future daughter cells, or they can arise from regular Z-rings, indicating that in some cells, Pmp23 inactivation impairs the assembly or stability of the Z-ring. In support of this idea, pulse-chase PG labeling experiments revealed that in Pmp23 mutant cells, the Z-ring can change its orientation or structure during the course of the division cycle, while the PBPs are actively synthesizing PG.

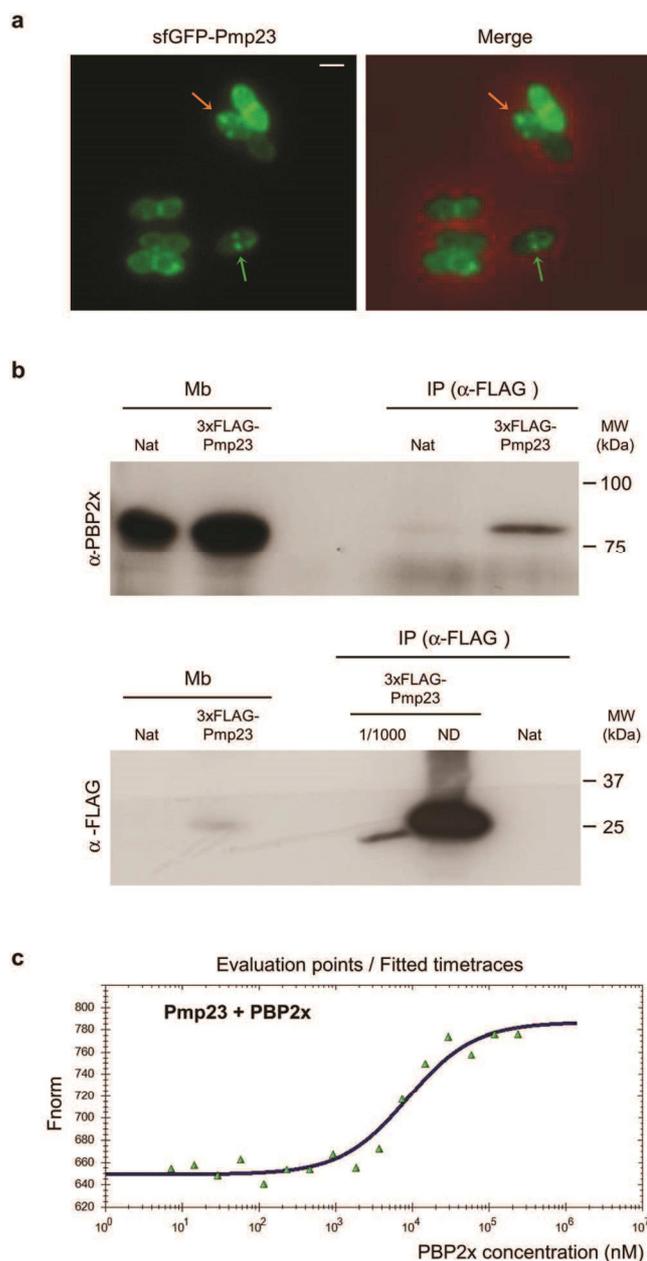


Figure 6. Pmp23 localizes to the division site and interacts with PBP2x. **(a)** Phase contrast (PC) and fluorescence microscopy images of live *S. pneumoniae* cells expressing an ectopic copy of *sfGFP-pmp23*. Examples of cells displaying sfGFP-Pmp23 septal localization (green arrows) and foci (orange arrows) are indicated. GFP fluorescence and merged images (between the GFP and the phase contrast channels) are shown. Scale bars = 1 μm . **(b)** Membrane proteins from *S. pneumoniae* cells expressing the native copy of *pmp23* (Nat) or a *3xflag-pmp23* fusion were solubilized with Triton X-100 and used for immunoprecipitation experiments using anti-FLAG resin. The analyzed samples correspond to the solubilized membrane proteins (Mb) and the immunoprecipitated fractions (IP). The anti-PBP2x serum and anti-FLAG antibodies used for the Western blot detection and molecular weight markers (MW) are indicated. ND, not diluted. **(c)** Affinity measurements by microscale thermophoresis of labeled GST-Pmp23 binding to increasing concentrations of PBP2x. Fnorm (normalized fluorescence = fluorescence after thermophoresis/initial fluorescence) is plotted against PBP2x concentration. Measures are represented by green dots and the fitted curve by a blue line.

Recently, MapZ, a substrate of the Ser/Thr kinase StkP, was shown to locate at the division site before FtsZ and serve as a beacon for FtsZ positioning and orientation at midcell^{12–14}. In the absence of MapZ, ~30% of cells display aberrant FtsZ structures¹². Imaging of MapZ in the absence of Pmp23 or in the presence of an inactive variant revealed that cells with slight dimension defects are always associated with a slight delocalization of MapZ around the cell periphery. Moreover, cells with major morphological defects all display abnormal MapZ structures. These observations suggest that although Pmp23 is not strictly required for MapZ positioning at midcell, its absence

leads to partial delocalization of MapZ and sometimes causes aberrant MapZ cellular structures. In addition, the fact that MapZ displays similar localization defects in $\Delta pmp23$ and $pmp23(E61Q)$ cells suggests that the role of Pmp23 in MapZ localization is due to its enzymatic activity rather than its physical presence.

Our data are thus consistent with the idea that PG modification by Pmp23 might be important for MapZ localization and stability of its macromolecular structure. Supporting this hypothesis, molecular docking showed that the MapZ extracellular and C-terminal domain could bind the glycan chains of PG, and deletion of this PG-binding domain results in MapZ delocalization^{12,34}. For example, MapZ localization might require a certain homogeneity of the glycan chain length or a certain flexibility of the septal PG, and these PG properties might require the lysozyme activity of Pmp23. In the absence of this putative hydrolase, abnormal PG properties due to abnormally long glycan strands could influence the ability of MapZ to interact with PG. However, MapZ binding to PG was not significantly affected when sacculi were purified from a strain deleted for $pmp23$ or expressing an inactive variant. We thus favor an alternative hypothesis in which Pmp23 would contribute to a “quality control” function aiming at correcting errors performed by PG synthases in the PG network. In support of this idea, Pmp23 localization is enriched at midcell where all the PG synthases are positioned^{11,30,32,37}, it interacts directly with PBP2x and we detected a slightly higher percentage of peptide crosslinks in PG purified from $\Delta pmp23$ mutant cells. Excessively crosslinked glycan strands might not be properly bound by MapZ because of steric hindrance or excessive rigidity of such strands. These improperly incorporated glycan strands might lead to partial delocalization of MapZ unless being degraded by Pmp23. In the absence of Pmp23 housekeeping activity, MapZ delocalization might lead to a subtle delocalization and/or disorientation of FtsZ and the PBPs, first causing slight morphological defects. As the cell cycle proceeds, slight localization and shape defects would be rapidly emphasized by active cell wall synthesis, eventually leading to abnormal structure of the division ring and severe morphological defects. Importantly, this second model is consistent with the previously reported MapZ delocalization upon perturbation of PG synthesis, and MapZ function in Z-ring positioning and orientation^{12–14}. Further studies are now needed to determine at the molecular level how MapZ binds PG and how the altered PG composition in the $pmp23$ mutants alters MapZ localization.

Many studies support the idea that early division proteins drive the localization and assembly of the cell wall synthesis machinery, which includes PG synthases and PG hydrolases. About 13 years ago, the pneumococcal CWH DacA (PBP3), which carries a D,D-carboxypeptidase activity, was shown to be required for proper orientation of FtsZ and PBP annular structures at midcell¹⁶. This work seeded the idea that CWHs are important for proper assembly and localization of the division machinery. More recently, similar defects in FtsZ positioning were observed in the absence of DacA (PBP5) and other low-molecular weight PBPs in *E. coli*³⁸. In the present work, we show that the lysozyme activity of Pmp23 is important for the stability of the earliest structure(s) assembling at the division site in *S. pneumoniae*, the MapZ ring(s) that guide Z-ring positioning and orientation at midcell^{12–14}. This work thus uncovers a new crosstalk between cell wall metabolism and cell division. Although most CWHs are not essential for bacterial survival in laboratory conditions, they might be important safeguards insuring that bacterial division proceeds properly.

Methods

Bacterial strains and plasmids. Strains, plasmids and oligonucleotides used in this study are listed in Tables S1 and S2.

Growth conditions, media and allelic replacement. *S. pneumoniae* strains were grown at 37 °C in CY medium³⁹ or in Todd Hewitt medium (TH, BD Sciences). Blood agar plates were made from Columbia agar containing 5% defibrinated horse blood (Difco) and the appropriate antibiotics (2.5 µg/ml tetracycline, 250 µg/ml kanamycin or 200 µg/ml streptomycin). Markerless allelic replacements were performed as described previously⁴⁰ using a two-step procedure based on a bicistronic *kan-rpsL* cassette called Janus to delete the genes of interest, replace them by fluorescent protein fusion or introduce point mutations.

3D homology modeling of Pmp23. The Swiss Model server (<http://swissmodel.expasy.org/>) was used to generate models of the soluble domain of Pmp23 based on the structures of CwlT from *C. difficile* and *S. aureus* (PDB codes 4HPE and 4FDY, respectively)²⁹. Both models display high confidence factors (~70%) and global QMEAN scoring functions of about -4.5.

Fluorescence microscopy acquisition and analysis. For phase contrast, GFP or mKate2 fluorescence imaging, cells were grown at 37 °C in CY medium until $OD_{600} = 0.3$, transferred to microscope slides, and observed at room temperature 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 (CCD) camera.

For labeling of cell wall synthesis regions, cells were grown in CY until $OD_{600} = 0.3$, pelleted at room temperature for 5 min at $4,000 \times g$, resuspended and incubated for 4 min in CY medium supplemented with 0.1 mM BADA. Cells were finally washed twice with CY medium to discard unbound dye, resuspended into pre-warmed medium and incubated for 4 min at 37 °C prior to microscopy observation.

For immunofluorescence microscopy, cells were grown in CY medium until $OD_{600} = 0.3$ and fixed for 15 min at room temperature and 45 min on ice in 4% (wt/vol) paraformaldehyde. After three washes in PBS, cells were resuspended in GTE buffer (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 20 mM Tris pH 7.5) and transferred onto poly-L-lysine-coated slides. The slides were incubated in PBS-0.2% Triton X-100 (vol/vol) for 5 min, air dried, incubated in methanol at -20 °C for 5 min and air dried again. After rehydration with PBS, the slides were blocked for 60 min at room temperature with PBS-0.2% Triton X-100-5% (wt/vol) BSA (PBS-Triton-BSA). The slides were incubated for 1 h at room temperature with 1:200 of mouse anti-FtsZ antibodies³⁰, in PBS-Triton-BSA. The slides

were washed with PBS-Triton-BSA and incubated for 1 h with a 1:200 dilution of Cy2-coupled anti-mouse IgG in PBS-Triton-BSA. Following washing, slides were mounted with 5% (wt/vol) polyvinyl alcohol.

Images were acquired using the Volocity software package. Image analysis was performed using the MicroTracker Matlab software⁴¹. Distributions of cell dimensions among cell populations were represented with box plots displaying the interquartile range (25th and 75th percentiles), the median value, and whiskers for minimum and maximum values. For nonparametric statistical analyses of our data, we performed U tests of Mann-Whitney⁴² using Prism7 (GraphPad), which provided the two-tailed distribution p-values indicated in Fig. 2 (with a critical value of 0.05).

Electron microscopy analysis. Cells were grown at 37 °C in CY medium until $OD_{600} = 0.3$, and centrifuged at $3,220 \times g$ for 10 min. A pellet volume of 1.4 μ l was dispensed on the 200- μ 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% OsO₄ and warmed up slowly (1 °C/h) to -60 °C (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 being rinsed 4 times in pure acetone. The samples were then infiltrated with gradually increasing concentrations of resin (Embed812, EMS) in acetone (1:2, 1:1, 2:1 [vol/vol]) for 3 h while raising the temperature to end at 20 °C. Pure resin was added at room temperature. After polymerization at 60 °C, 80-nm-thin sections were obtained using an ultramicrotome UC7 (Leica Microsystems) and were collected on formvar-carbon-coated 100-mesh copper grids. The thin sections were post stained for 5 min with 5% aqueous uranyl acetate, rinsed, and incubated for 2 min with lead citrate. The samples were observed using a CM12 (Philips) or Tecnai G2 Spirit BioTwin (FEI) microscope operating at 120 kV with an Orius SC1000B CCD camera (Gatan).

Preparation of *S. pneumoniae* sacculi. Sacculi were prepared from wild-type (Spn5) and $\Delta pmp23$ (spMJ26) *S. pneumoniae* cells as described previously³¹. Briefly, 2 l of culture in TH were harvested when OD_{600} reached 0.4–0.5 and resuspended in 40 ml of ice-cooled 50 mM Tris-HCl at pH 7.0. The cell suspension was poured dropwise into 150 ml of boiling 5% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution and boiled for another 30 min. Sacculi were then harvested by centrifugation at room temperature and washed five times with water to remove SDS. Sacculi were disrupted with glass beads before treatment with DNaseI (10 μ g/ml) and RNaseI (50 μ g/ml) for 2 h at 37 °C in PBS supplemented with 20 mM MgSO₄. This step was followed by addition of 10 mM CaCl₂ and 100 μ g/ml trypsin, and overnight incubation at 37 °C. The cell wall samples were boiled again in 1% SDS for 15 min, harvested by centrifugation at room temperature and washed several times with water before samples were stored in water at 4 °C.

For some of the *in vitro* Pmp23 activity assays, teichoic acid removal was performed by incubating the purified sacculi with 10% w/v aqueous trichloroacetic acid (TCA) overnight at 4 °C. The peptidoglycan fraction was pelleted by centrifugation (21,000 $\times g$, 20 min, room temperature), washed and resuspended in water. Another batch of purified sacculi was chemically *N*-acetylated by addition of 0.25 volumes of 5% acetic anhydride and 0.25 volumes of saturated NaHCO₃, incubation on ice for 30 min followed by 1 h at room temperature, as described by Vollmer and Tomasz⁴³. The peptidoglycan was pelleted by centrifugation, washed and resuspended in water. To label sacculi with Remazol Brilliant Blue (RBB, Sigma-Aldrich), sacculi were incubated overnight at 37 °C with 20 mM RBB in 250 mM NaOH, followed by neutralization with HCl. The RBB-labeled sacculi were pelleted by centrifugation and washed with water until the supernatant was clear. The final pellet was resuspended in 1 ml of water and stored at 4 °C.

Peptidoglycan digestion assays. Five μ l of RBB-labeled sacculi were incubated overnight at 37 °C with 5 μ M GST-Pmp23 or 4 μ M mutanolysin, as a positive control, in 100 μ l buffer A (50 mM Mes pH 6.0, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.5 mM DDM). Reactions were terminated by incubation for 5 min at 95 °C. Soluble cleavage products were separated from intact peptidoglycan by centrifugation (21,000 $\times g$ for 10 min at room temperature). The supernatant was collected, and the absorbance was measured at 595 nm. Alternatively, 20 μ l of unlabeled sacculi were incubated overnight at 37 °C with 5 μ M GST-Pmp23 or 4 μ M mutanolysin in 100 μ l in buffer A. To monitor sacculi digestion, the absorbance was measured at 595 nm. Identical assays were performed on sacculi containing or not teichoic acids, and treated or not for chemical *N*-acetylation.

Preparation of muropeptides and analysis of peptidoglycan composition. Experiments were performed as previously described³⁵. In brief, cell wall samples were lyophilized overnight and incubated with 48% hydrofluoric acid for 48 h to remove secondary cell wall polymers. The resulting PG was digested with the muramidase cellosyl for 48 h at 37 °C with stirring. After cellosyl was inactivated by boiling for 10 min at 100 °C, the samples were reduced with sodium borohydride and the muropeptides were separated by HPLC (High-performance liquid chromatography) on a 250 \times 4.6 mm 3 μ m Prontosil 120-3-6 C18 AQ reversed-phase column (Bischoff, Leonberg, Germany). The eluted muropeptides were detected by their absorbance at 205 nm.

Protein purification. To produce full-length Pmp23, two-liter cultures of *E. coli* BL21 (DE3) cells transformed with the pMJ18 plasmid (*pGex4T1:gst-pmp23*) were grown in Terrific Broth (BD Biosciences) at 37 °C until $OD_{600} = 0.8$. Protein production was induced with 0.5 mM IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside) and cultures were further grown overnight at 16 °C. Cells were harvested by centrifugation and resuspended in 1/25th volume buffer B (100 mM Mes pH 6.0, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT), containing the CompleteTM cocktail of protease inhibitor (Roche). Cell lysis was carried out using a Microfluidizer[®] M110-P (Microfluidics) at 10,000 psi and cell debris were pelleted by centrifugation at 40,000 $\times g$ for 30 min at 4 °C. The membrane fraction contained in the supernatant was separated by ultracentrifugation at 250,000 $\times g$ for 1 h at 4 °C. The membrane pellet was resuspended in 22 ml buffer B, solubilized with 10 mM of the nonionic detergent DDM

(n-dodecyl- β -d-maltopyranoside, Sigma), and incubated overnight at 4 °C on a rotating wheel. After ultracentrifugation (250,000 \times g, 1 h, 4 °C), the supernatant containing the solubilized membrane proteins was loaded on a Glutathione Sepharose affinity resin (GE Healthcare). After extensive wash, the protein was eluted in buffer C (50 mM Mes pH 6.0, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.5 mM DDM, 10 mM reduced glutathione).

The GST-PBP2x recombinant construct was produced and purified as previously described³¹. Briefly, purification was performed in buffer D (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl) using a Glutathione Sepharose affinity resin. After load and extensive wash, the resin was incubated with thrombin for 1 h at room temperature to cleave the GST and release PBP2x in the flow-through. Flow-through fractions were concentrated with Amicon Ultra centrifugation filter units (molecular weight cut-off of 30,000; Millipore) and injected onto a 10/300 GL Superdex 200 gel filtration column (GE Healthcare). Proteins were eluted in a buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, and were concentrated again with Amicon Ultra centrifugation filter units.

The recombinant plasmid overproducing the extracellular domain His₇-MapZ_{extra2}³⁴ was transformed into BL21(DE3) *E. coli* strain. The transformants were grown at 37 °C until the culture reached an OD₆₀₀ = 0.6 in LB medium. Expression was induced by adding 0.5 mM IPTG and incubation was continued for 3 h. Proteins were purified on a Ni-NTA resin (Qiagen); the fractions corresponding to the pure protein were pooled and dialyzed overnight at 4 °C as described previously³⁴. Protein concentration was determined using a Coomassie Assay Protein Dosage Reagent (Uptima) and aliquots were stored at -80 °C.

Protein concentrations were measured using absorbance at 280 nm.

MapZ cell wall binding. Pneumococcal cell wall preparation as well as the procedure used to analyze MapZ binding to the cell wall was performed as previously described³¹. Briefly, 3 μ g of purified His₇-MapZ_{extra2} were incubated with or without purified *S. pneumoniae* cell wall (2.5 mg) in 300 μ l of a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and 100 mM NaCl for 16 h at 4 °C on a rotating platform. After centrifugation (5 min at 5,000 \times g), the supernatant was removed (supernatant fraction S) and the cell wall pellet was washed three times with PBS and resuspended in 50 μ l SDS-PAGE loading buffer. After incubation at 100 °C for 10 min, the supernatant, corresponding to His₇-MapZ_{extra2} bound to the cell wall, was recovered from the cell wall pellet (pellet fraction P) by centrifugation (5 min at 5,000 \times g). The different fractions were analysed by SDS-PAGE and Western immunoblotting. Detection of His₇-MapZ_{extra2} was performed using mouse anti-histidine antibodies (Sigma). A goat anti-mouse secondary antibody HRP conjugate (Biorad) was used at 1/5,000 to reveal the immunoblots.

MapZ phosphorylation analysis. After protein separation by 4–12% gradient SDS-PAGE, detection of MapZ phosphorylation in crude extracts of *S. pneumoniae* WT and *pmp23* mutant strains was performed by immunoblotting using an anti-phosphothreonine polyclonal antibody (Cell Signaling) at 1/2,000 as described previously⁴⁴. A goat anti-rabbit secondary antibody HRP conjugate (Biorad) was used at 1/5,000 to reveal the immunoblots.

Immunoprecipitation from detergent-solubilized membrane fractions. Immunoprecipitation experiments were adapted from³¹. One-liter cultures of *S. pneumoniae* strain R6 and spMJ15 were grown in TH medium containing 0.15 mM ZnCl₂ for expression of *3xflag-pmp23*. Cells were harvested at OD₆₀₀ = 0.3 by centrifugation (5,000 \times g for 5 min at room temperature) and protoplasted by incubation at 37 °C for 3 h into 10 ml buffer A. The protoplasts were collected by centrifugation (8,000 \times g for 10 min at 4 °C) and flash frozen in liquid N₂. Thawed protoplasts were disrupted by osmotic lysis with 3 ml buffer B and membrane proteins were solubilized by addition of 2% Triton X-100. Incubation was carried out on a rotating wheel for 2 h at 4 °C. Cell debris were pelleted by ultracentrifugation (140,000 \times g for 30 min at 4 °C) and the supernatant containing solubilized membrane proteins was collected. For each immunoprecipitation experiment, 500 μ l of solubilized membrane proteins were incubated with 10 μ l of anti-FLAG agarose resin (Sigma). After 5 h of incubation at 4 °C with gentle shaking, the resin was washed three times with buffer B-2% Triton before elution with 75 μ l of FLAG peptide (Sigma). Proteins were separated by 12.5% SDS-PAGE and subjected to western blotting using appropriate anti-FLAG and anti-PBP2x sera dilutions.

Microscale thermophoresis. Binding experiments were carried out with a Monolith NT.115 Series instrument (Nano Temper Technologies GmbH). GST-Pmp23 was labeled with the red dye NT-647. Four μ l of sample containing 100 nM of labeled Pmp23 and increasing concentrations of PBP2x (from 7 nM to 235 μ M) or BSA (negative control, from 5 nM to 360 μ M) were loaded on K003 Monolith NT.115 hydrophilic treated silicon capillaries and thermophoresis was measured for 30 s. Each measurement was made in triplicates. Experiments were carried out at 25 °C in MST optimized buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.05% Tween-20). Analysis was performed with the Monolith software. Affinity K_D was quantified by analyzing the change in normalized fluorescence (F_{norm} = fluorescence after thermophoresis/initial fluorescence) as a function of the concentration of the PBP2x protein.

References

- Vollmer, W., Blanot, D. & de Pedro, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 149–167 (2008).
- Meeske, A. J. *et al.* SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature* **537**, 634–638 (2016).
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A. & Charlier, P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 234–258 (2008).
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P. & Foster, S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 259–286 (2008).
- Heijenoort, J. van. Peptidoglycan Hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**, 636–663 (2011).
- Höltje, J.-V. Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 181–203 (1998).
- Haeusser, D. P. & Margolin, W. Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 305–319 (2016).
- Sham, L.-T., Tsui, H.-C. T., Land, A. D., Barendt, S. M. & Winkler, M. E. Recent advances in pneumococcal peptidoglycan biosynthesis suggest new vaccine and antimicrobial targets. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 194–203 (2012).

9. Egan, A. J. F. & Vollmer, W. The physiology of bacterial cell division. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1277**, 8–28 (2013).
10. Massidda, O., Nováková, L. & Vollmer, W. From models to pathogens: how much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division? *Environ. Microbiol.* **15**, 3133–3157 (2013).
11. Fleurie, A. *et al.* Interplay of the Serine/Threonine-Kinase StkP and the Paralogs DivIVA and GpsB in Pneumococcal Cell Elongation and Division. *PLoS Genet* **10**, e1004275 (2014).
12. Fleurie, A. *et al.* MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* **516**, 259–262 (2014).
13. Holečková, N. *et al.* LocZ Is a New Cell Division Protein Involved in Proper Septum Placement in *Streptococcus pneumoniae*. *mBio* **6**, e01700–14 (2015).
14. van Raaphorst, R., Kjos, M. & Veening, J.-W. Chromosome segregation drives division site selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, E5959–E5968 (2017).
15. Schuster, C., Dobrinski, B. & Hakenbeck, R. Unusual septum formation in *Streptococcus pneumoniae* mutants with an alteration in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3. *J. Bacteriol.* **172**, 6499–6505 (1990).
16. Morlot, C., Noirclerc-Savoie, M., Zapun, A., Dideberg, O. & Vernet, T. The d,d-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **51**, 1641–1648 (2004).
17. Ng, W.-L., Kazmierczak, K. M. & Winkler, M. E. Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator. *Mol. Microbiol.* **53**, 1161–1175 (2004).
18. Pagliero, E. *et al.* The inactivation of a new peptidoglycan hydrolase Pmp23 leads to abnormal septum formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Open Microbiol. J.* **2**, 107–114 (2008).
19. Barendt, S. M., Sham, L.-T. & Winkler, M. E. 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. *J. Bacteriol.* **193**, 2290–2300 (2011).
20. Tsui, H.-C. T. *et al.* 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. *Mol. Microbiol.* **100**, 1039–1065 (2016).
21. Bartual, S. G. *et al.* Structural basis of PcsB-mediated cell separation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Commun.* **5**, 3842 (2014).
22. Morlot, C. *et al.* Crystal Structure of a Peptidoglycan Synthesis Regulatory Factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **280**, 15984–15991 (2005).
23. Abdullah, M. R. *et al.* Structure of the pneumococcal l,d-carboxypeptidase DacB and pathophysiological effects of disabled cell wall hydrolases DacA and DacB. *Mol. Microbiol.* **93**, 1183–1206 (2014).
24. Hoyland, C. N. *et al.* Structure of the LdcB LD-Carboxypeptidase Reveals the Molecular Basis of Peptidoglycan Recognition. *Structure* **22**, 949–960 (2014).
25. Rivas, B. D. L., García, J. L., López, R. & García, P. Purification and Polar Localization of Pneumococcal LytB, a Putative Endo- β -N-Acetylglucosaminidase: the Chain-Dispersing Murein Hydrolase. *J. Bacteriol.* **184**, 4988–5000 (2002).
26. Pagliero, E., Dideberg, O., Vernet, T. & Guilmi, A. M. D. The PECACE domain: a new family of enzymes with potential peptidoglycan cleavage activity in Gram-positive bacteria. *BMC Genomics* **6**, 19 (2005).
27. Martín-Galiano, A. J., Yuste, J., Cercenado, M. I. & de la Campa, A. G. Inspecting the potential physiological and biomedical value of 44 conserved uncharacterised proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Genomics* **15**, 652 (2014).
28. Fukushima, T. *et al.* Identification and Characterization of Novel Cell Wall Hydrolase CwlT: a two-domain autolysin exhibiting N-acetylmuramidase and DL-endopeptidase activities. *J. Biol. Chem.* **283**, 11117–11125 (2008).
29. Xu, Q. *et al.* Structures of a Bifunctional Cell Wall Hydrolase CwlT Containing a Novel Bacterial Lysozyme and an NlpC/P60 dl-Endopeptidase. *J. Mol. Biol.* **426**, 169–184 (2014).
30. Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O. & Vernet, T. Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol. Microbiol.* **50**, 845–855 (2003).
31. Morlot, C. *et al.* Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in *Streptococcus pneumoniae* R6 morphogenesis. *Mol. Microbiol.* **90**, 88–102 (2013).
32. Zapun, A., Vernet, T. & Pinho, M. G. The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 345–360 (2008).
33. Kuru, E. *et al.* In Situ Probing of Newly Synthesized Peptidoglycan in Live Bacteria with Fluorescent D-Amino Acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 12519–12523 (2012).
34. Manuse, S. *et al.* Structure–function analysis of the extracellular domain of the pneumococcal cell division site positioning protein MapZ. *Nat. Commun.* **7**, 12071 (2016).
35. Bui, N. K. *et al.* Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*. *Anal. Biochem.* **421**, 657–666 (2012).
36. Wheeler, R., Mesnage, S., Boneca, I. G., Hobbs, J. K. & Foster, S. J. Super-resolution microscopy reveals cell wall dynamics and peptidoglycan architecture in ovococcal bacteria. *Mol. Microbiol.* **82**, 1096–1109 (2011).
37. Tsui, H.-C. T. *et al.* Pbp2x localizes separately from Pbp2b and other peptidoglycan synthesis proteins during later stages of cell division of *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* **94**, 21–40 (2014).
38. Potluri, L.-P., de Pedro, M. A. & Young, K. D. *Escherichia coli* low-molecular-weight penicillin-binding proteins help orient septal FtsZ, and their absence leads to asymmetric cell division and branching. *Mol. Microbiol.* **84**, 203–224 (2012).
39. Lacks, S. & Hotchkiss, R. D. A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 508–518 (1960).
40. 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).
41. Sliusarenko, O., Heinritz, J., Emonet, T. & Jacobs-Wagner, C. High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics. *Mol. Microbiol.* **80**, 612–627 (2011).
42. Mann, H. B. & Whitney, D. R. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Ann. Math. Stat.* **18**, 50–60 (1947).
43. Vollmer, W. & Tomasz, A. The pgdA Gene Encodes for a Peptidoglycan N-Acetylglucosamine Deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 20496–20501 (2000).
44. Fleurie, A. *et al.* Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **83**, 746–758 (2012).

Acknowledgements

We thank André Zapun for stimulating discussions about Pmp23 function, members of the Vernet laboratory for advice and encouragement, and Maud Tournoud for advice in statistical analyses. Support for this work comes from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-12-BSV3-0008-04 PiBaKi to AMDG; ANR-14-CE14-0003 ORBIMP to MJ and ANR-16-CE11-0016 DIVinHD to CMo), the Université Grenoble Alpes to CMo, the pole ARC1 Santé of the Rhône-Alpes region to CA, and the Wellcome Trust (101824/Z/13/Z, to WV). This work used the platforms of the the Grenoble Instruct-ERIC Center (ISBG: UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB).

Author Contributions

M.J., C.G. and C.Mo. designed research; M.J., C.A., S.M., C.Me., L.B., K.P., B.G., J.G. performed experiments; M.J., W.V., A.M.D.G., C.G. and C.Mo. analyzed data; T.D. provided anti-G.F.P. antibodies, Y.V.B. and M.S.V.N. provided FDAAs; M.J., C.G. and C.Mo. wrote the paper; M.J., W.V., A.M.D.G., T.V., C.G. and C.Mo. revised the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25882-y>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

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



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Annexe 2 : Peptidoglycan O-acetylation is functionally related to cell wall biosynthesis and cell division in *Streptococcus pneumoniae*

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

Julie Bonnet ¹, Claire Durmort ¹,
Maxime Jacq ^{1†}, Isabelle Mortier-Barrière,²
Nathalie Campo ²,
Michael S. VanNieuwenhze ³, Yves V. Brun ⁴,
Christopher Arthaud,¹ Benoit Gallet ¹,
Christine Moriscot,¹ Cécile Morlot ¹,
Thierry Vernet ¹ and Anne Marie Di Guilmi ^{1*‡}

¹Institut de Biologie Structurale (IBS), University Grenoble Alpes, CEA, CNRS, 38044 Grenoble, France.

²Laboratoire 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.

Departments of ³Chemistry and ⁴Biology, Indiana University, Bloomington, IN, USA.

Summary

The peptidoglycan 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-(β -1,4)-*N*-acetylglucosamine (MurNAc-GlcNAc) disaccharides associated through cross-linked peptide stems. The peptidoglycan is continually remodelled 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. This modification 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 its physiological function. In this study, we have investigated to what extend peptidoglycan O-acetylation is involved in cell wall

biosynthesis and cell division of *Streptococcus pneumoniae*. We show that O-acetylation driven by Adr protects the peptidoglycan of dividing cells from cleavage by the major autolysin LytA and occurs at the septal site. Our results support a function for Adr in the formation of robust and mature MurNAc O-acetylated peptidoglycan and infer its role in the division of the pneumococcus.

Introduction

The bacterial cell wall is essential as 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-(β -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 β -lactam antibiotics) (for reviews on PBPs, see: Sauvage *et al.*, 2008; Egan *et al.*, 2015; Sauvage and Terrak, 2016). Endogenous peptidoglycan hydrolases cleave the peptidoglycan polymer to insert new material and to allow daughter cells separation and peptidoglycan maturation (Smith *et al.*, 2000; Vollmer *et al.*, 2008, 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. Carboxypeptidases and endopeptidases cleave the stem peptide. *N*-acetylglucosaminidases and *N*-acetylmuramidases cut

Accepted 23 September, 2017. *For correspondence. E-mail anne-marie.di-guilmi@cea.fr; Tel. +33 1 46 54 98 57; Fax +33(0)1 46 54 99 06. Present addresses: [†]Department of Biology, Indiana University, Bloomington, IN, USA. [‡]CEA, 18 route du panorama, 92265 Fontenay-aux-roses, France.

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 remodelling. 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 (Bernard *et al.*, 2011; Laaberki *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, 2008a; Moynihan and 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 *et al.*, 2013 for review).

O-acetylation of MurNAc residues is a two-step process. First, the acetyl group from a donor molecule is transported from the cytoplasm to the periplasm or the extracellular space. Second, 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 catalyses the acetylation reaction (Moynihan and 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 catalyses 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 and gastrointestinal tract (Callewaert and Michiels, 2010 for review; Davis and Weiser, 2011). The substrate-binding site of lysozyme involves amino acids residues that interact with the acetyl groups as well as residues lining the active site that

recognize C6-OH groups of MurNAc (Blake *et al.*, 1965; Vocadlo *et al.*, 2001). By consequence, acetylation of the glycan residues causes a steric hindrance that reduces the affinity of lysozyme for the C6-OH groups (Moynihan and Clarke, 2011).

In Gram-negative bacteria, peptidoglycan O-acetylation is also involved in lysozyme resistance, cell wall metabolism, pathogenesis (Moynihan and Clarke, 2011; Moynihan *et al.*, 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 the peptidoglycan metabolism, which would be a means to localize the hydrolytic activities (Weadge *et al.*, 2005; Weadge and Clarke, 2006). This genes cluster is also present in some Gram-positive bacteria from the *Bacillus* genus (Weadge *et al.*, 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 peptidoglycan 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), as the absence of Adr resulted in the loss of peptidoglycan O-acetylation (Crisóstomo *et al.*, 2006). Here, we show that peptidoglycan O-acetylation protects growing pneumococcal cells from lysis induced by the major pneumococcal autolysin LytA. In addition, we demonstrate that peptides cross-links and O-acetylation are peptidoglycan maturation processes functionally related and that Adr is also linked to the cell division machinery.

Results

The absence of Adr expression increases S. pneumoniae LytA-dependent lysis during exponential growth

PgdA and Adr proteins are responsible for peptidoglycan *N*-deacetylation and O-acetylation in *S. pneumoniae* respectively. As both modifications have been shown to

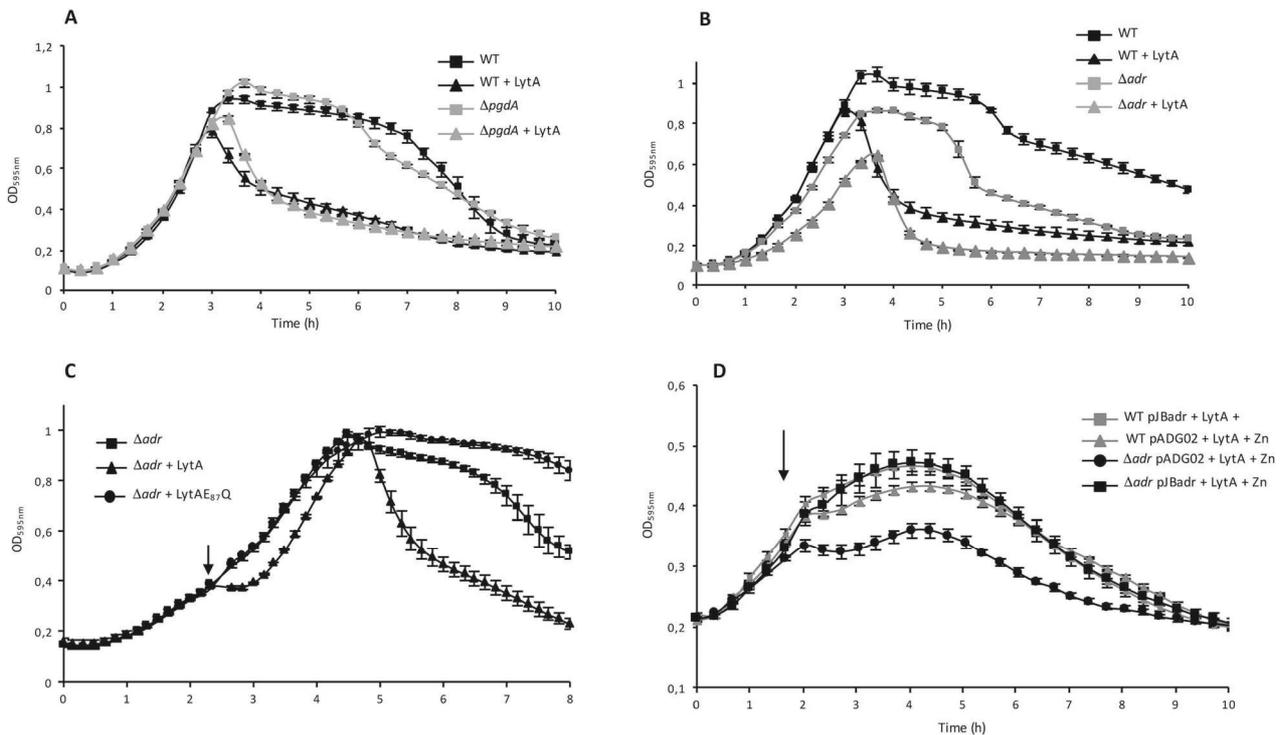


Fig. 1. Effect of LytA on pneumococci in exponential growth phase in CY medium.

A. Growth curves of WT and $\Delta pgdA$ strains in the absence or in the presence of LytA at $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.

B. Growth curves of WT and Δadr strains in the absence or in the presence of LytA at $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.

C. Growth curves of Δadr strain in the presence of active LytA or inactive LytAE₈₇Q forms, both proteins (final concentration of $10 \mu\text{g ml}^{-1}$) were added at mid-exponential phase, $OD_{595\text{nm}}$ 0.3–0.4 as indicated by the arrow.

D. Complementation of the *adr* gene deletion. The pneumococcal Δadr 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 ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) was added at mid-exponential phase ($OD_{595\text{nm}}$ 0.3–0.4, arrow).

protect peptidoglycan from lysozyme cleavage, we wondered whether they affect the action of the major pneumococcal autolysin LytA (Tomasz, 1968; Howard and 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 the stationary phase, during nutrient depletion or if the peptidoglycan biosynthesis machinery is inhibited by antibiotics (Tomasz and 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 Δadr mutant strains were tested for their sensitivity towards LytA. 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 $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Fig. 1A and B). 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 as rapid decrease of $OD_{595\text{nm}}$ was observed in cultures containing LytA compared to the cultures performed in the

absence of LytA (Fig. 1A). 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 Δadr strain is sensitive to LytA in exponential phase as growth was slowed down in the presence of LytA when compared to the WT strain (Fig. 1B). 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 Δadr strain is more sensitive to the action of released endogenous LytA (Fig. 1B). Deletion of the endogenous *lytA* in the WT and Δadr genetic backgrounds did not affect sensitivity towards exogenous LytA suggesting that Adr alone is responsible for the observed phenotype (Supporting Information Fig. S1).

Complementary experiments were performed by adding purified LytA at the final concentration of $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ into the culture at mid-exponential growth phase (Fig. 1C and D). While the WT growth was slightly reduced, a growth arrest was observed as

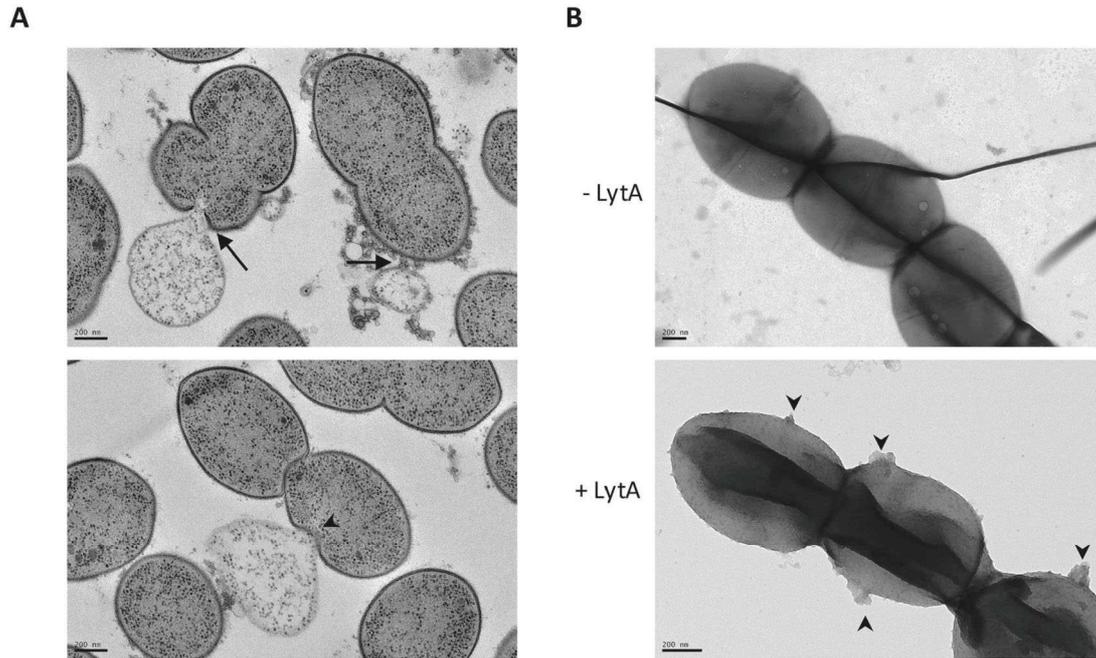


Fig. 2. LytA induces cell lysis of growing cells harbouring unacetylated peptidoglycan.

A. Transmission electron micrographs of thin sections of Δadr cells harvested at mid-exponential growth phase and incubated with $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of LytA for 20 min at $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ 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).

soon as LytA was added to the Δadr culture (Fig. 1C). Importantly, no effect was detected on addition of the inactive LytAE_{87Q} variant, indicating that the enzymatic activity of LytA (and not the protein presence) accounts for the impairment of the growth rate during Δadr exponential phase (Fig. 1C). As expected, no effect of the LytAE_{87Q} form was observed on the WT strain (Supporting Information Fig. S2). To verify that the effect of *adr* deletion was not polar, the Δadr strain was complemented with an ectopic copy of the *adr* gene placed under the control of a Zn-inducible promoter. The Δadr strains carrying the plasmid encoding *adr* (pJBadr) or the empty plasmid (pADG02) were grown in the presence of Zn (Fig. 1D). As expected, in the absence of *adr*, growth was arrested as soon as LytA was added in the culture at mid-exponential phase ($\text{OD}_{595\text{nm}}$ 0.3) while expression of the ectopic copy of *adr* allowed cells to multiply and reach $\text{OD}_{595\text{nm}}$ 0.5 (Fig. 1D). This result shows that the presence of Adr restored the protection against LytA although the WT phenotype was not fully recovered (Fig. 1D and Supporting Information Fig. S3), 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 Δadr strain to LytA during exponential growth was associated with cell lysis. To investigate this phenomenon, growing Δadr 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 Δadr cells showed disruptions of the cell envelope at the poles (Fig. 2A, arrows) and at the septal site (Fig. 2A, arrow heads), causing the release of cytoplasmic content. Statistical analysis of images such as those shown in Fig. 2A revealed that 16% of Δadr 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 behaviour of the cell population and they are further supported by the observation of similar LytA-induced lysis events in whole Δadr cells observed by TEM (Fig. 2B, arrow heads). We then propose that the growth delay induced by LytA observed in Δadr cultures is due to the killing of the LytA-targeted cells while non-lysed

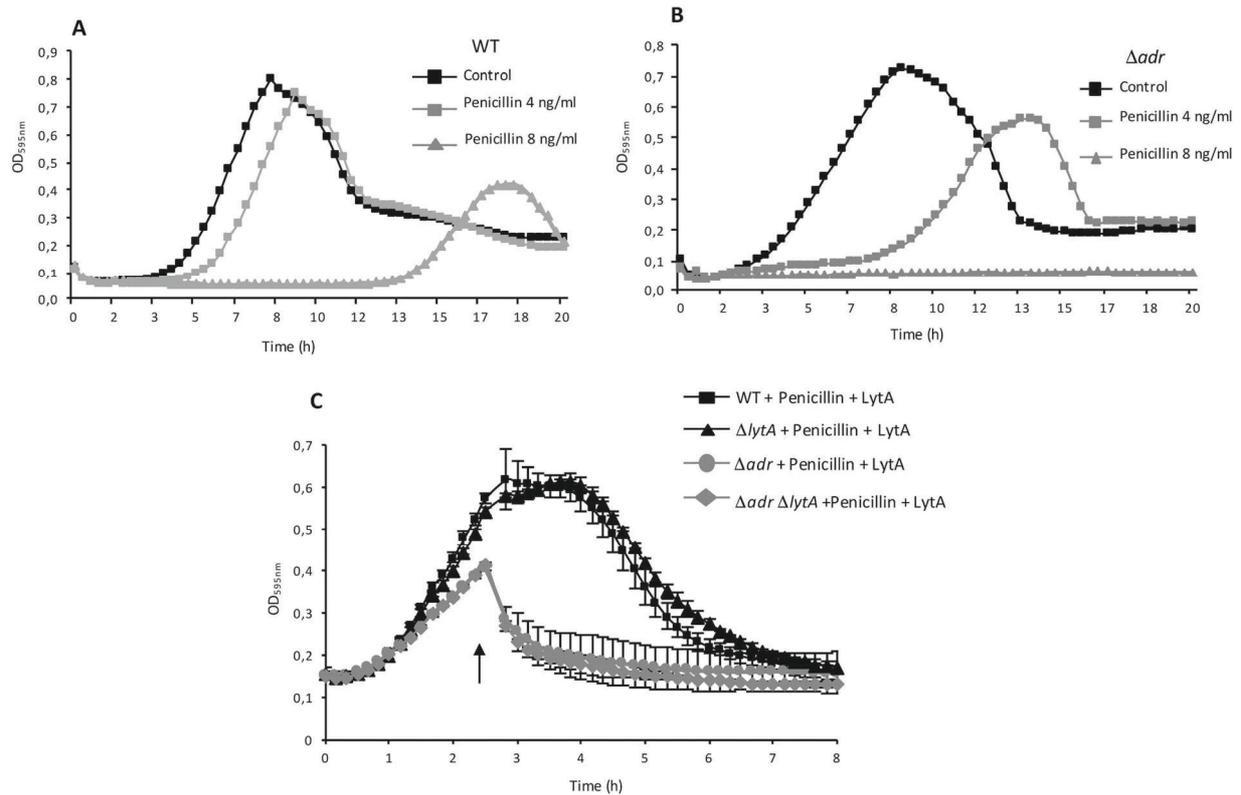


Fig. 3. Unacetylated peptidoglycan is more sensitive to penicillin-induced lysis.

A. Growth curves of WT strain in the absence or the presence of penicillin at 4 and 8 ng ml⁻¹.

B. Growth curves of Δadr strain in the absence or the presence of penicillin at 4 and 8 ng ml⁻¹.

C. Sensitivity to cell lysis mediated by penicillin (4 ng ml⁻¹) and LytA (10 μ g ml⁻¹), the latter was added at mid-exponential phase (arrow).

neighbouring 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 *S. pneumoniae* sensitivity to β -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 β -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 Δadr and WT strains to penicillin was investigated by comparing the growth profiles of these strains in the presence of 4 and 8 ng ml⁻¹ of penicillin, which are concentrations lower than the minimal inhibitory concentration value (16 ng ml⁻¹). Growth of

the WT strain was only slightly delayed (by about 1 h) in the presence of 4 ng ml⁻¹ of penicillin and largely delayed (by about 10 h) by 8 ng ml⁻¹ of penicillin (Fig. 3A). Growth of the Δadr 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⁻¹ of penicillin (Fig. 3B). As 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 (Supporting Information Fig. S4). 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 (Crisóstomo *et al.*, 2006) and that it acts independently from endogenous LytA. As the Δadr 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, Δadr , $\Delta lytA$ and $\Delta adr \Delta lytA$ strains were performed in the presence of 8 ng ml⁻¹ of penicillin and LytA was added at mid-exponential phase. Single Δadr and double $\Delta adr \Delta lytA$ strains were more sensitive to lysis in the presence of both penicillin and

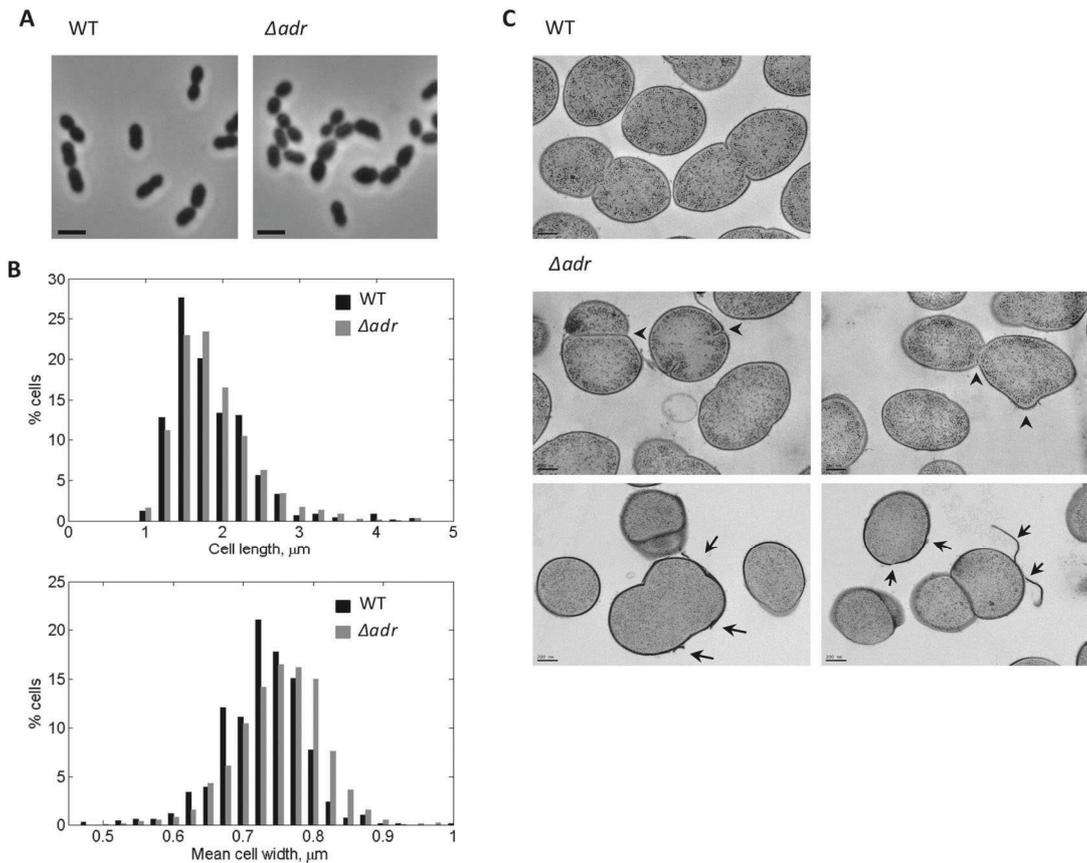


Fig. 4. Morphological analysis of pneumococcal Δadr cells.

A. Phase contrast microscopy images of WT and Δadr exponentially growing cells in CY medium. Scale bars, 2 μm .

B. Distribution of the length (upper panel) and width parameters (lower panel) of Δadr 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 Δadr 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 destructures.

LytA than the WT and $\Delta lytA$ strains (Fig. 3C and Supporting Information Fig. S5). 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 catalysed by the PBPs and the O-acetylation of MurNAc performed by Adr might be functionally dependent activities.

Morphology and cell wall defects of the Δadr strain

To further study the relationship between O-acetylation and peptidoglycan synthesis, we analysed the morphology of the Δadr strain by light microscopy. A significant proportion of Δadr cells (about 36%) were wider than the WT cells (Fig. 4A and B). Additional analysis of morphological defects displayed by Δadr cells was performed by TEM in conditions that preserve cellular ultrastructures as described above. The mutants cells

revealed altered shape with misplaced or non-linear septa (Fig. 4C arrow heads). The cell wall of Δadr cells also presented important structural defects as fragments detaching from the cell surface were observed (Fig. 4C arrows). Altogether, these results confirm that in the absence of O-acetylation, the peptidoglycan network is less structured, which in turn impacts the cell morphology.

Adr co-localizes with the division machinery at the onset of the cell cycle

Defects of the Δadr 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 (Supporting Information Fig. S6A) was fused to the superfolder green fluorescent protein (sfGFP) variant, which was engineered to display more

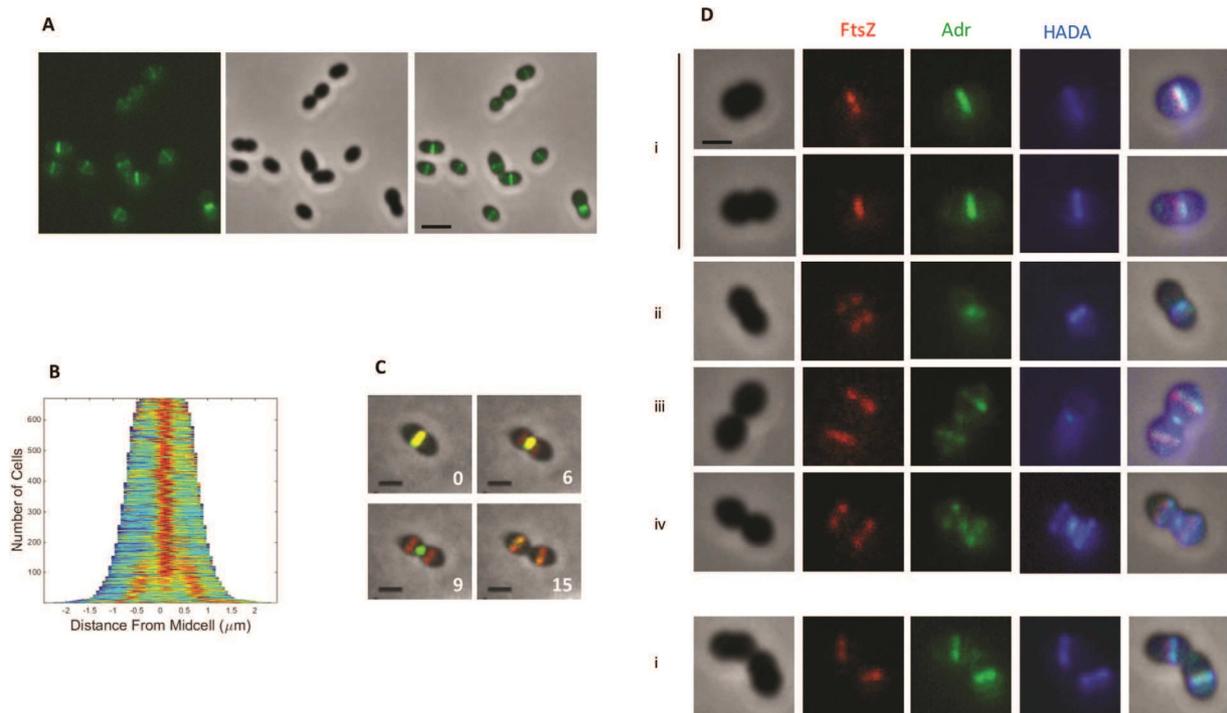


Fig. 5. Localization of Adr in WT cells.

A. Adr-sfGFPop localization in WT cells. GFP fluorescent signal (left), phase contrast (middle) and merge (right) images are shown. Scale bars, 2 μ 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 (grey), GFP (green) and mKate (red) are shown. Stills are from Movie S2. Scale bar, 2 μ m.

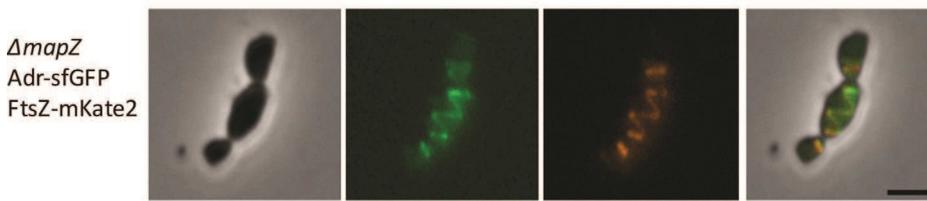
D. Pulse labelling with HADA of WT cells producing FtsZ-mKate2 and Adr-sfGFPop. Marks i to iv indicate stages of cell division. Scale bars, 2 μ m.

robust refolding properties (Pédelacq *et al.*, 2006) and was successfully used to detect fusion proteins exported in the periplasm of *E. coli* (Dinh and Bernhardt, 2011; Dammeyer and Tinnfield, 2012). The sfGFP 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 (Supporting Information Fig. S6B). 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 (Fig. 5A and B) (Supporting Information 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 (Supporting Information Fig. S6C). Time-lapse experiments 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. 5C, panels 0 and 15 min and Supporting Information Video 2). 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. 5C, panels 6 and 9 min and Supporting Information 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, 2013; Tsui *et al.*, 2014). To determine the timing of Adr localization relative to peptidoglycan synthesis, the regions of active peptidoglycan synthesis were labelled by short incubation times with fluorescently labelled D-amino acids (HADA) (Kuru *et al.*, 2012) (Fig. 5D). At early division stages (i), FtsZ and Adr co-localize at mid-cell where new peptidoglycan is synthesized. When FtsZ rings re-localize 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.

A



B

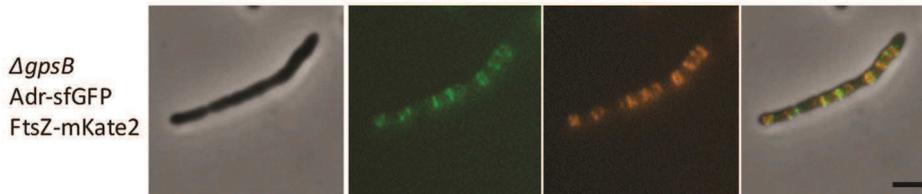


Fig. 6. Mislocalization of Adr and FtsZ-mKate2 in $\Delta mapZ$ and $\Delta gpsB$ cells.

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 μm .
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 μm .

Maintenance of the bacterial cell shape is a complex process that involves multi-protein machineries composed by peptidoglycan biosynthetic enzymes and regulatory proteins (Massida *et al.*, 2013; Egan *et al.*, 2015, for reviews). Among those, we focused on two proteins: MapZ that forms ring structures at the division site and locates FtsZ through direct protein-protein interactions (Fleurie *et al.*, 2014a) 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 analysed in the $\Delta mapZ$ and $\Delta gpsB$ backgrounds (Fig. 6). FtsZ-mKate2 displayed helical organization and ladder-like positioning in $\Delta mapZ$ and $\Delta gpsB$ strains, respectively, as already described (Land *et al.*, 2013; Fleurie *et al.*, 2014a, 2014b). Interestingly, Adr-sfGFP perfectly colocalized with FtsZ-mKate2 in these two strains (Fig. 6). It is worth mentioning that no significant alteration of Adr positioning was observed in $\Delta pbp1a$, $\Delta pbp2a$, $\Delta pbp1b$ and $\Delta pbp3cter$ strains (Supporting Information Fig. S7) (Schuster *et al.*, 1990; Paik *et al.*, 1999). FtsZ-mKate2 was expressed in Δadr 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. 7A). 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 Δadr strain together with altered FtsZ-mKate2 positioning (Fig. 7B and Supporting Information Video 3). In conclusion, the expression of FtsZ-mKate2 in Δadr cells induces a more severe phenotype than in the WT cells indicating that this fusion is not fully functional. The partial loss of FtsZ function when it is fused to fluorescent protein has already been reported (Marteyn *et al.*,

2014). Altogether, these data show that in pneumococcal WT cells and in division mutants, Adr and FtsZ colocalize, strongly suggesting that the function of Adr is related to the cell division process.

Discussion

Deletion of *adr* gene encoding an O-acetylase increases LytA-dependent lysis of *S. pneumoniae* during exponential growth phase. From these results, we infer that O-acetylation of MurNAc residues protects peptidoglycan 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 formerly exclude a minor compensatory effect of other activities in peptidoglycan metabolism.

LytA cleaves the amide bond between MurNAc and L-alanine (Howard and 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 as 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 $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) is attained and initiates the lysis process (Mellroth *et al.*, 2012). Pneumococcal

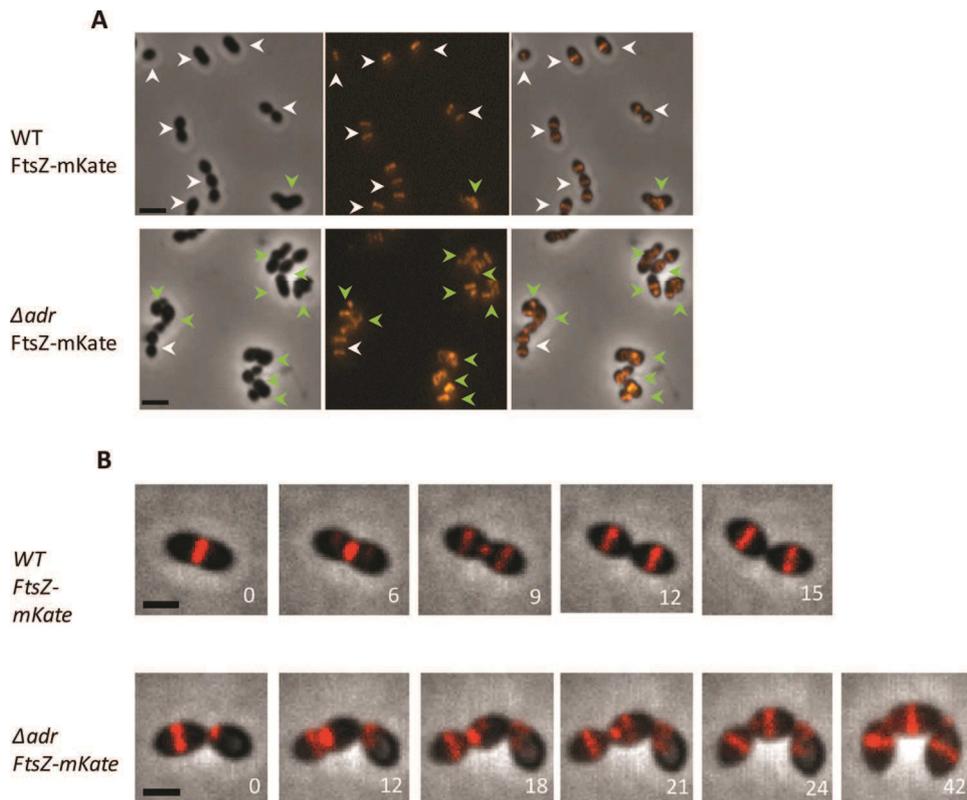


Fig. 7. Mislocalization of FtsZ-mKate2 in Δadr cells.

A. FtsZ-mKate2 localization in WT and Δadr 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 μ m.

B. Distribution of the length parameter (upper panel) and width parameter (lower panel) of Δadr cells ($n = 1786$) compared to Δadr 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 Δadr cells expressing FtsZ-mKate. Overlays between phase contrast (grey), GFP (green) and mKate2 (red) are shown. Stills are from Movie S3. Scale bar, 2 μ m.

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 on entry into the stationary phase, nutrient depletion or inhibition by antibiotics (Tomasz and Waks, 1975; Mellroth *et al.*, 2012).

O-acetylation reaction must be performed on nascent peptidoglycan as no O-acetylated groups has been detected on the precursor lipid II (see Vollmer, 2008a for review). Our data suggest that O-acetylation of MurNAC is related to peptidoglycan formation as 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, 2008a) and yet not updated led to the same hypothesis, that is, 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* (Sido *et al.*, 1990) and *Proteus mirabilis* (Martin and Gmeiner, 1979). In *N. gonorrhoeae*, this same effect was shown to be associated to the inhibition of PBP2 (Dougherty, 1983, 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-deacetylated peptidoglycan is more sensitive to the lysis induced by penicillin (Crisóstomo *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. 8, 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). Δadr 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 Δadr 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; 2013; Jacq *et al.*, 2015). Like StkP and PBPs, the

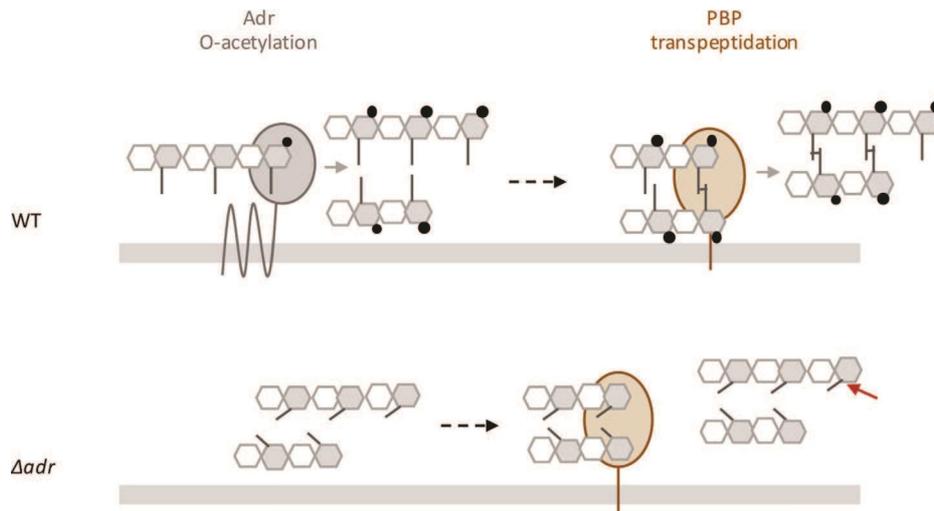


Fig. 8. Model of the functional interplay between O-acetylation and transpeptidation.

Adr protein which catalyses the O-acetylation reaction is represented as a multimembrane protein (for details, see Supporting Information Fig S6A). 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 other (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. Noncleavage of the amide bond by LytA in O-acetylation 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 where exponential growth and peptidoglycan synthesis take place (upper panel), Adr O-acetylates MurNAc residues on glycan strands before transpeptidation to produce mature peptidoglycan. In such a structure, the amide bond is not accessible, impeding its cleavage by LytA and thus conferring resistance towards cell lysis. The absence of Adr (Δadr strain) induces alteration of the peptidoglycan structure, which in turns affects the transpeptidation efficiency, increases the sensitivity to LytA cleavage (the amide bond cleavage site is indicated by the red arrow), alters the cell morphology and impacts the division process (the latter two features are not represented in the figure).

septal localization of Adr lags just behind FtsZ, which itself is beacons by MapZ (Fleurie *et al.*, 2014a). 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, that is, 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 this is in agreement with the idea that peptidoglycan O-acetylation is an important reaction in the process of peptidoglycan synthesis and maturation as well as 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.

Experimental procedures

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 P_{czcD} promoter [bgaA::PZn-gfp+] (Amp^R , Tet^R). 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 BssHIII 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 BssHIII and BsiWI and inserted into pADG02 between BssHIII and BsiWI [bgaA:: P_{czcD} -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. The synthetic gene encoding the superfolder 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

Table 1. Pneumococcal strains, plasmids and oligonucleotides used in this study.

Constructs	Genotype/description/sequence	Source
S. pneumoniae strains		
R6		
R800	R6 <i>rpsL1</i> ; <i>Str^R</i>	Sung <i>et al.</i> (2001)
<i>ftsZ-kan-rpsL</i>	R800; <i>ftsZ::ftsZ-kan-rpsL</i> ; <i>Kan^R</i>	Fleurie <i>et al.</i> (2014a)
<i>ftsZ-mKate</i>	R800 <i>ftsZ::ftsZ-mKate</i> ; <i>Str^R</i>	This work
R800 <i>P_{Zn}-adr</i>	R800 <i>bgaA::P_{czcD}-adr (pJBadr)</i> ; <i>Str^R</i> , <i>Tet^R</i>	This work
R800 <i>P_{Zn}</i>	R800 <i>bgaA::P_{czcD} (pADG02)</i> ; <i>Str^R</i> , <i>Tet^R</i>	This work
R6 Δ <i>lytA</i>	R6 <i>lytA::cat</i> ; <i>Cat^R</i>	Pagliero <i>et al.</i> (2008)
Δ <i>lytA</i>	R800 <i>lytA::cat</i> ; <i>Str^R</i> <i>Cat^R</i>	This work
Δ <i>adr-kan-rpsL</i>	R800 <i>adr::kan-rpsL</i> ; <i>Kan^R</i>	This work
Δ <i>adr</i>	R800 <i>adr::Δadr</i> ; <i>Str^R</i>	This work
Δ <i>adr P_{Zn}-adr</i>	R800 <i>adr::Δadr bgaA::P_{czcD}-adr (pJBadr)</i> ; <i>Str^R</i> , <i>Tet^R</i>	
Δ <i>adr P_{Zn}</i>	R800 <i>adr::Δadr bgaA::P_{czcD} (pADG02)</i> ; <i>Str^R</i> , <i>Tet^R</i>	
Δ <i>pgdA-kan-rpsL</i>	R800 <i>pgdA::kan-rpsL</i> , <i>Kan^R</i>	This work
Δ <i>adr ΔlytA</i>	R800 <i>adr::Δadr lytA::cat</i> ; <i>Str^R</i> , <i>Cat^R</i>	This work
Δ <i>pgdA ΔlytA</i>	R800 <i>pgdA::kan-rpsL</i> ; <i>ftsZ::ftsZ-mKate</i> ; <i>Kan^R</i> , <i>Cat^R</i>	This work
<i>adr-sfGFPop</i>	R800 <i>adr::adr-sfGFPop</i> ; <i>Str^R</i>	This work
Δ <i>adr ftsZ-kan-rpsL</i>	R800 <i>adr::Δadr ftsZ::ftsZ-kan-rpsL</i> ; <i>Kan^R</i>	This work
Δ <i>adr ftsZ-mKate</i>	R800 <i>adr::Δadr</i> ; <i>ftsZ::ftsZ-mKate</i> ; <i>Str^R</i>	This work
Δ <i>adr-kan-rpsL ftsZ-mKate</i>	R800 <i>adr::kan-rpsL</i> ; <i>ftsZ::ftsZ-mKate</i> ; <i>Kan^R</i>	This work
<i>adr-sfGFPop ftsZ-mKate</i>	R800 <i>adr::adr-sfGFPop ftsZ::ftsZ-mKate</i> ; <i>Str^R</i>	This work
Δ <i>mapZ</i>	R800 <i>mapZ::ΔmapZ</i> ; <i>Str^R</i>	Fleurie <i>et al.</i> (2014a)
Δ <i>mapZ Δadr-kan-rpsL</i>	R800 <i>mapZ::ΔmapZ adr::kan-rpsL</i> ; <i>Kan^R</i>	This work
Δ <i>mapZ adr-sfGFPop ftsZ-mKate</i>	R800 <i>mapZ::ΔmapZ adr::adr-sfGFPop ftsZ::ftsZ-mKate</i> ; <i>Str^R</i>	This work
Δ <i>gpsB</i>	R800 <i>gpsB::gpsB</i> ; <i>Str^R</i>	Fleurie <i>et al.</i> (2014b)
Δ <i>gpsB Δadr-kan-rpsL</i>	R800 <i>gpsB::gpsB adr::kan-rpsL</i> ; <i>Kan^R</i>	This work
Δ <i>gpsB adr-sfGFPop ftsZ-mKate</i>	R800 <i>gpsB::gpsB adr::adr-sfGFPop ftsZ::ftsZ-mKate</i> ; <i>Str^R</i>	This work
Δ <i>pbp1a</i>	R6, <i>Cat^R</i>	Paik <i>et al.</i> (1999)
Δ <i>pbp1a rpsL1</i>	R6 <i>rpsL1 pbp1a::cat</i> ; <i>Cat^R</i> , <i>Str^R</i>	This work
Δ <i>pbp1a Δadr-kan-rpsL</i>	R6 <i>rpsL1 pbp1a::cat adr::kan-rpsL</i> ; <i>Cat^R</i> , <i>Kan^R</i>	This work
Δ <i>pbp1a adr-sfGFPop</i>	R6 <i>rpsL1 pbp1a::cat adr::adr-sfGFPop</i> ; <i>Cat^R</i> , <i>Str^R</i>	This work
Δ <i>pbp1b</i>	R6, <i>Cat^R</i>	Paik <i>et al.</i> (1999)
Δ <i>pbp1b rpsL1</i>	R6 <i>rpsL1 pbp1b::cat</i> ; <i>Cat^R</i> , <i>Str^R</i>	This work
Δ <i>pbp1b Δadr-kan-rpsL</i>	R6 <i>rpsL1 pbp1b::cat adr::kan-rpsL</i> ; <i>Cat^R</i> , <i>Kan^R</i>	This work
Δ <i>pbp1b adr-sfGFPop</i>	R6 <i>rpsL1 pbp1b::cat adr::adr-sfGFPop</i> ; <i>Cat^R</i> , <i>Str^R</i>	This work
Δ <i>pbp2a</i>	R6, <i>Cat^R</i>	Paik <i>et al.</i> (1999)
Δ <i>pbp2a rpsL1</i>	R6 <i>rpsL1 pbp2a::cat</i> ; <i>Cat^R</i> , <i>Str^R</i>	This work
Δ <i>pbp2a Δadr-kan-rpsL</i>	R6 <i>rpsL1 pbp2a::cat adr::kan-rpsL</i> ; <i>Cat^R</i> , <i>Kan^R</i>	This work
Δ <i>pbp2a adr-sfGFPop</i>	R6 <i>rpsL1 pbp2a::cat adr::adr-sfGFPop</i> ; <i>Cat^R</i> , <i>Str^R</i>	This work
Δ <i>pbp3</i>	R6, <i>dacAC-ter::ery</i> ; <i>Ery^R</i>	Schuster <i>et al.</i> (1990)
Δ <i>pbp3 rpsL1</i>	R6 <i>rpsL1, dacAC-ter::ery</i> ; <i>Ery^R</i>	This work
Δ <i>pbp3 Δadr-kan-rpsL</i>	R6 <i>rpsL1 dacAC-ter::ery adr::kan-rpsL</i> ; <i>Ery^R</i> , <i>Kan^R</i>	This work
Δ <i>pbp3 adr-sfGFPop</i>	R6 <i>rpsL1 dacAC-ter::ery adr::adr-sfGFPop</i> ; <i>Ery^R</i> , <i>Str^R</i>	This work
Plasmids		
pJWV25	[<i>bgaA::P_{Zn}-gfp+</i>], <i>Amp^R</i> , <i>Tet^R</i>	Eberhardt <i>et al.</i> (2009)
pCM38	[<i>bgaA::P_{Zn}-gfp+</i>], <i>Amp^R</i> , <i>Tet^R</i> , <i>Agel</i>	This work
pCM83	[<i>bgaA::P_{Zn}-sfGFPop</i>], <i>Amp^R</i> , <i>Tet^R</i> , <i>Agel</i>	This work
pADG0	[<i>bgaA::P_{Zn}-sfGFPop</i>], <i>Amp^R</i> , <i>Tet^R</i> , <i>Agel</i> , <i>BssHIII</i> , <i>BsiWI</i>	This work
pADG02	[<i>bgaA::P_{Zn}</i>], <i>Amp^R</i> , <i>Tet^R</i> , <i>Agel</i> , <i>BssHIII</i> , <i>BsiWI</i>	This work
pJBadr	[<i>bgaA::P_{Zn}-adr</i>], <i>Amp^R</i> , <i>Tet^R</i> , <i>Agel</i> , <i>BssHIII</i> , <i>BsiWI</i>	This work
pET28-His-LytA	pET28a:: <i>his-lytA</i> <i>Kan^R</i> , <i>Cm^R</i>	Philippe <i>et al.</i> (2015)
pET28-His-LytAE87Q	pET28a:: <i>his-lytAE87A</i> <i>Kan^R</i> , <i>Cm^R</i>	This work
Oligonucleotides		
FORoJB1	ggctatgggcttgatgagttc To amplify <i>lytA::cat</i> cassette	This work
FORoJB2	gcatcaaggatcatcatcattc To amplify <i>lytA::cat</i> cassette	This work
FORoJB3	actgtcttcccagcttcg amplification upstream of the <i>adr</i> gene	This work
REVoJB6	acctgccaagttacctgtcg amplification downstream of the <i>adr</i> gene	This work
REVoJB7	ttagatccggatccctcgagttttgatttaaccggcttgcttgag Construction of <i>adr-sfGFPop</i>	This work

Table 1: Continued

Constructs	Genotype/description/sequence	Source
FORoJB8	atggatgaattgtacaaataactc aag aca agccggttaaac Construction of <i>adr-sfGFPop</i>	This work
FORoJB9	ctcgagggatccggatctaaaggtgaagagtggtt <i>sfGFPop</i> amplification	This work
REVoJB10	ttgtacaattcatcatacc <i>sfGFPop</i> amplification	This work
REVoJB35	taaccggctgtctacgagttattctcttcattgtac Construction of <i>adr::Δadr</i>	This work
FORoJB36	gaagaataaacctgtaagacagccggttaaatcaaaataac Construction of <i>adr::Δadr</i>	This work
FORoJB57	cgcgcgcatgcatgataaagtttctctgattaggattatag Construction of pJBadr	This work
REVoJB58	gcgcgtagcttattttgatttaaccggctgtcttgagctgt Construction of pJBadr	This work
FORoMJ129	gatagcgcagttccgatga Construction of <i>pgdA::kan-rpsI</i>	This work
FORoMJ62	ggtgaatggcttcaatcagttgaaccgctcataggtctcagc 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	ttgattgaccgcaggaacga Construction of <i>pgdA::kan-rpsI</i>	This work
FORoMJ142	cataaaaatcaaacggatctgccagctctagtctac Construction of <i>pgdA::kan-rpsI</i>	This work
FORoMJ143	aggggccaggtctcagctgactatagctgtgatg Construction of <i>pgdA::kan-rpsI</i>	This work
FORoMJ42	cctatccgctcttgaagc amplification upstream of the	Jacq <i>et al.</i> (2015)
FORoMJ47	<i>ftsZ</i> gene for <i>ftsZ-kan-rpsI</i> and <i>ftsZ-mKate</i> amplification ctttaaagacatggttctctctac amplification downstream of the	Jacq <i>et al.</i> (2015)
P1	<i>ftsZ</i> gene for <i>ftsZ-kan-rpsI</i> and <i>ftsZ-mKate</i> amplification ccgttgatttttaatggataatg <i>Kan-rpsI</i> amplification	This work
P2	agagacctggcccttcc <i>Kan-rpsI</i> amplification	This work
F1rpsL1	ggtggtgtattctgtgtgggt Forward rpsL1 amplification	This work
R1rpsL1	aactgggacttgtagttagaaccac Reverse rpsL1 amplification	This work

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

method avoids polar effects and allows expression of the fusion proteins at physiological levels.

Protein expression and purification

Strain BL21(*DE3*) Rosetta pLysS Rare (Cm^R) of *E. coli* was transformed with the plasmid pET28-His-LytA (Kan^R) or pET28-His-LytAE_{87Q} (Kan^R). Cells were grown in Luria Bertani medium and protein expression was induced at OD_{595nm} 0.6 with 0.5 mM IPTG (isopropyl β-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 × 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%CO₂ in C medium supplemented with 0.5% yeast extract (Lacks and Hotchkiss, 1960) (CY) or in Todd Hewitt medium (TH; BD Sciences). For strains harbouring a zinc-inducible plasmid, CY was supplemented with 0.15 mM ZnCl₂ 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 CaCl₂. Cells were

grown for 2 h at 37°C/5%CO₂, and transformants were selected on Columbia (BD Sciences) blood (4%) agar plates containing the appropriate antibiotics (streptomycin 400 µg ml⁻¹, kanamycin 300 µg ml⁻¹, chloramphenicol 4.5 µg ml⁻¹).

Continuous growth was followed by inoculating 3 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 OD₅₉₅ 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 µg ml⁻¹ either at OD_{595nm} 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 µg ml⁻¹. Penicillin sensitivity was determined by adding 4 or 8 ng ml⁻¹ to CY medium.

For labelling of newly synthesized peptidoglycan, cells were grown in CY at OD_{595nm} 0.4 at 37°C/5%CO₂, 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%CO₂ in CY to OD_{595nm} 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 analysed using the open-source softwares MicrobeTracker (Sliusarenko *et al.*, 2011) and Oufiti (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_{595nm} of 0.1. An agarose pad containing CY medium and 1.2% low-melting agarose was prepared on a microscopy slide. A volume of 2.5 µl of culture was loaded on the agarose pad, a coverslip was mounted and the samples were observed. Images were acquired every 3 or 6 min during 1 h 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 cMOS 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 coloured 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 CO₂ to OD_{595nm} 0.3–0.4, recombinant His-LytA was added at a final concentration of 10 µg ml⁻¹ and incubation was pursued for 7 min. Cells were centrifuged at 4500 × g for 5 min. A pellet volume of 1.4 µl was dispensed on the 200 µm 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% OsO₄ and warmed up slowly (1°C h⁻¹) to –60°C in an automated freeze substitution device (AFS2; Leica Microsystems). After 8 to 12 h, the temperature was raised (1°C h⁻¹) to –30°C, and the samples were kept at this temperature for another 8 to 12 h before a step for 1 h at 0°C, cooled down to 30°C and then rinsed four 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 24 h 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_{595nm} 0.3 and incubated or not with LytA at 5 µg ml⁻¹ during 20 min at 37°C/5% CO₂. Cell lysis was stopped by the addition of glutaraldehyde at a final concentration of 2%. Cells were centrifuged 10 min at 4500 × g, resuspended in 100 µl of PBS 2% glutaraldehyde and incubated for 1 h at RT. The fixed cells were washed three times and resuspended in 50 µl 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).

Acknowledgements

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 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 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.

References

- Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W., and Götz, F. (2005) Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **55**: 778–787.
- Bernard, E., Rolain, T., Courtin, P., Guillot, A., Langella, P., Hols, P., *et al.* (2011) Characterization of O-acetylation of N-acetylglucosamine: a novel structural variation of bacterial peptidoglycan. *J Biol Chem* **286**: 23950–23958.
- Bernard, E., Rolain, T., David, B., André, G., Dupres, V., Dufrière, Y.F., *et al.* (2012) Dual role for the O-acetyltransferase OatA in peptidoglycan modification and control of cell septation in *Lactobacillus plantarum*. *PLoS One* **7**: e47893.
- Blake, C., Koenig, D., Mair, G., and North, A. (1965) Structure of an hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature* **206**: 757–761.
- Blair, D.E., Schüttelkopf, A.W., MacRae, J.I., and van Aalten, D.M. (2005) Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 15429–15434.
- Brown, S., Santa Maria, J.P., Jr., and Walker, S. (2013) Wall teichoic acids of Gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **67**: 313–336.
- Callewaert, L., and Michiels, C.W. (2010) Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci* **35**: 127–160.
- Crisóstomo, M.I., Vollmer, W., Kharat, A.S., Inhülsen, S., Gehre, F., Buckenmaier, S., *et al.* (2006) Attenuation of penicillin resistance in a peptidoglycan O-acetyl transferase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **61**: 1497–1509.
- Dammeyer, T., and Tinnfield, P. (2012) Engineered fluorescence proteins illuminate the bacterial periplasm. *Comput Struct Biotechnol J* **3**: e201210013.
- Davis, K.M., and Weiser, J.N. (2011) Modifications of the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection. *Infect Immun* **79**: 562–570.
- Dinh, T., and Bernhardt, T.G. (2011) Using superfolder green fluorescent protein for periplasmic protein localization studies. *J Bacteriol* **193**: 4984–4987.
- Dougherty, T.J. (1983) Peptidoglycan biosynthesis in *Neisseria gonorrhoeae* strains sensitive and intrinsically resistant to beta-lactam antibiotics. *J Bacteriol* **153**: 429–435.
- Dougherty, T.J. (1985) Involvement of a change in penicillin target and peptidoglycan structure in low-level resistance to beta-lactam antibiotics in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob Agents Chemother* **28**: 90–95.
- Eberhardt, A., Wu, L.J., Errington, J., Vollmer, W., and Veening, J.W. (2009) Cellular localization of choline-utilization proteins in *Streptococcus pneumoniae* using novel fluorescent reporter systems. *Mol Microbiol* **74**: 395–408.
- Egan, A.J.F., Biboy, J., Van't Veer, I., Breukink, E., and Vollmer, W. (2015) Activities and regulation of peptidoglycan synthases. *Philos Trans R Soc B* **370**: 20150031.
- Emami, K., Guyet, A., Kawai, Y., Devi, J., Wu, L.J., Allenby, N., *et al.* (2017) RodA as the missing glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* and antibiotic discovery for the peptidoglycan polymerase pathway. *Nat Microbiol* **2**: 16253.
- Fleurie, A., Lesterlin, C., Manuse, S., Zhao, C., Cluzel, C., Lavergne, J.P., *et al.* (2014a) MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* **516**: 259–262.
- Fleurie, A., Manuse, S., Zhao, C., Campo, N., Cluzel, C., Lavergne, J.P., *et al.* (2014b) Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. *PLoS Genet* **10**: e1004275.
- Howard, L.V., and Gooder, H. (1974) Specificity of the autolysin of *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae*. *J Bacteriol* **117**: 796–804.
- Iwata, T., Watanabe, A., Kusumoto, M., and Akiba, M. (2016) Peptidoglycan acetylation of *Campylobacter jejuni* is essential for maintaining cell wall integrity and colonization in chicken intestines. *Appl Environ Microbiol* **82**: 6284–6290.
- Jacq, M., Adam, V., Bourgeois, D., Moriscot, C., Di Guilmi, A.M., Vernet, T., *et al.* (2015) Remodeling of the Z-ring nanostructure during *Streptococcus pneumoniae* cell cycle revealed by photoactivated localization microscopy. *mBio* **6**: e01108-15.
- Kuru, E., Velocity Hughes, H., Brown, P.J., Hall, E., Tekkam, S., Cava, F., *et al.* (2012) In situ probing of newly synthesized peptidoglycan in live bacteria with fluorescent D-amino acids. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**: 12519–12523.
- Laaberki, M.H., Pfeffer, J., Clarke, A.J., and Dworkin, J. (2011) O-Acetylation of peptidoglycan is required for proper cell separation and S-layer anchoring in *Bacillus anthracis*. *J Biol Chem* **286**: 5278–5288.
- Lacks, S., and Hotchkiss, K.D. (1960) A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochim Biophys Acta* **39**: 508–518.
- Land, A.D., Tsui, H.C.T., Kocaoglu, O., Vella, S.A., Shaw, S.L., Keen, S.K., *et al.* (2013) Requirement of essential Pbp2x and GpsB for septal ring closure in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol* **90**: 939–955.
- Marteyn, B.S., Karimova, G., Fenton, A.K., Gazi, A.D., West, N., Touqui, L., *et al.* (2014) ZapE is a novel cell division protein interacting with FtsZ and modulating the Z-ring dynamics. *mBio* **5**: e00022–e00014.
- Martin, H.H., and Gmeiner, J. (1979) Modification of peptidoglycan structure by penicillin action in cell walls of *Proteus mirabilis*. *Eur J Biochem* **95**: 487–495.
- Massida, O., Novakova, L., and Vollmer, W. (2013) From models to pathogens: how much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division? *Environ Microbiol* **15**: 3133–3157.
- Meeske, A.J., Riley, E.P., Robins, W.P., Uehara, T., Mekalanos, J.J., Kahne, D., *et al.* (2016) SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature* **537**: 634–638.
- Mellroth, P., Daniels, R., Eberhardt, A., Rönnlund, D., Blom, H., Widengren, J., *et al.* (2012) LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan. *J Biol Chem* **287**: 11018–11029.

- Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003) Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol Microbiol* **50**: 845–855.
- Morlot, C., Bayle, L., Jacq, M., Fleurie, A., Tourcier, G., Galisson, F., et al. (2013) Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in *Streptococcus pneumoniae* R6 morphogenesis. *Mol Microbiol* **90**: 88–102.
- Moynihan, P.J., and Clarke, A.J. (2010) O-acetylation of peptidoglycan in gram-negative bacteria: identification and characterization of peptidoglycan O-acetyltransferase in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Biol Chem* **285**: 13264–13273.
- Moynihan, P.J., and Clarke, A.J. (2011) O-acetylation peptidoglycan: controlling the activity of bacterial autolysins and lytic enzymes of innate immune systems. *Int J Biochem Cell Biol* **43**: 1655–1659.
- Moynihan, P.J., Sychantha, D., and Clarke, A.J. (2014) Chemical biology of peptidoglycan acetylation and deacetylation. *Bioorg Chem* **54**: 44–50.
- Pagliari, E., Dublet, B., Frehel, C., Dideberg, O., Vernet, T., and Di Guilmi, A.M. (2008) The inactivation of a new peptidoglycan hydrolase Pmp23 leads to abnormal septum formation in *Streptococcus pneumoniae*. *The Open Microbiol J* **2**: 107–114.
- Paik, J., Kern, I., Lurz, R., and Hakenbeck, R. (1999) Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins. *J Bacteriol* **181**: 3852–3856.
- Paintdakhi, A., Parry, B., Campos, M., Irnov, I., Elf, J., Surovtsev, I., et al. (2016) Oufiti: an integrated software package for high-accuracy, high-throughput quantitative microscopy analysis. *Mol Microbiol* **99**: 767–777.
- Pédelaq, J.D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T.C., and Waldo, G.S. (2006) Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **24**: 79–88.
- Pfeffer, J.M., Strating, H., Weadge, J.T., and Clarke, A.J. (2006) Peptidoglycan O-acetylation and autolysin profile of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *J Bacteriol* **188**: 902–908.
- Philippe, J., Gallet, B., Morlot, C., Denapate, D., Hakenbeck, R., Chen, Y., et al. (2015) Mechanism of β -lactam action in *Streptococcus pneumoniae*: the piperacillin paradox. *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 609–621.
- Sandalova, T., Lee, M., Henriques-Normark, B., Heseck, D., Mobashery, S., Mellroth, P., 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. *Mol Microbiol* **101**: 954–967.
- Sauvage, E., and Terrak, M. (2016) Glycosyltransferases and Transpeptidases/Penicillin-Binding Proteins: valuable targets for new antibacterials. *Antibiotics* **5**: 12.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P. (2008) The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 234–258.
- Schuster, C., Dobrinski, B., and Hakenbeck, R. (1990) Unusual septum formation in *Streptococcus pneumoniae* mutants with an alteration in the d,d-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3. *J Bacteriol* **172**: 6499–6505.
- Sido, T., Johannsen, L., and Labischinski, H. (1990) Penicillin-induced changes in the cell wall composition of *Staphylococcus aureus* before the onset of bacteriolysis. *Arch Microbiol* **154**: 73–81.
- Sliusarenko, O., Heinritz, J., Emonet, T., and Jacobs-Wagner, C. (2011) High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics. *Mol Microbiol* **80**: 612–627.
- Smith, T.J., Blackman, S.A., and Foster, S.J. (2000) Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* **146**: 249–262.
- Sung, C.K., Li, H., Claverys, J.P., and Morrison, D.A. (2001) An *rpsL* cassette, *Janus*, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5190–5196.
- Tomasz, A. (1968) Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of pneumococcus: chain formation, loss of transformability, and loss of autolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **59**: 86–93.
- Tomasz, A., and Waks, S. (1975) Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 4162–4166.
- Tsui, T., Boersma, M.J., Vella, S.A., Kocaoglu, O., Kuru, E., Peceny, J.K., et al. (2014) Pbp2x localizes separately from Pbp2b and other peptidoglycan synthesis proteins during later stages of cell division of *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol* **94**: 21–40.
- Vocadlo, D.J., Davies, G.J., Laine, R., and Withers, S.G. (2001) Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* **412**: 835–838.
- Vollmer, W. (2008a) Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 287–306.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S. (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 259–286.
- Weadge, J.T., and Clarke, A.J. (2006) Identification and characterization of O-acetylpeptidoglycan esterase: a novel enzyme discovered in *Neisseria gonorrhoeae*. *Biochemistry* **45**: 839–851.
- Weadge, J.T., Pfeffer, J.M., and Clarke, A.J. (2005) Identification of a new family of enzymes with potential O-acetylpeptidoglycan esterase activity in both Gram-positive and Gram-negative bacteria. *BMC Microbiol* **5**: 49.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Annexe 3 : Analyse du peptidoglycane de *S. pneumoniae*

Source : Bui et al. 2012

Table 1
Modifications in monomeric, dimeric, and trimeric muropeptides from strain R6.

Monomers/ oligomers (% of total)	Muropeptide or modification	Relative percentage ^a (%)
Monomers (35.9)	Tri	79.9
	Tetra	11.8
	Penta	8.4
	Unmodified	43.7
	Deacetylated	18.5
	Glutamate	12.6
	Deacetylated/glutamate	5.0
	O-Acetylated	n.d.
	-GlcNAc	0.3
	-GlcNAc-MurNAc	n.d.
	Ala-Ala	8.1
	Ser-Ala	29.7
	Dimers (25.9)	TetraTri
Unmodified		19.0
Deacetylated		45.1
Glutamate		1.8
Deacetylated/glutamate		1.8
O-Acetylated		n.d.
Missing GlcNAc		n.d.
Missing (GlcNAc-MurNAc)		n.d.
Ala-Ala		18.5
Ser-Ala		74.8
Trimers (9.6)	TetraTetraTri	97.9
	TetraTetraTetra	2.1
	Unmodified	2.1
	Deacetylated	14.2
	Glutamate	n.d.
	Deacetylated/glutamate	n.d.
	O-Acetylated	8.1
	Missing GlcNAc	11.9
	Missing (GlcNAc-MurNAc)	8.1
	Ala-Ala	31.7
	Ser-Ala	45.6

Note: n.d., not detected.

^a Percentage of muropeptides or modifications in monomers, dimers, or trimers.

BIBLIOGRAPHIE

- Aarsman, M.E.G., Piette, A., Fraipont, C., Vinkenvleugel, T.M.F., Nguyen-Distèche, M., and den Blaauwen, T. (2005). Maturation of the Escherichia coli divisome occurs in two steps. *Mol. Microbiol.* 55, 1631-1645.
- Abdullah, M.R., Gutiérrez-Fernández, J., Pribyl, T., Gisch, N., Saleh, M., Rohde, M., Petruschka, L., Burchhardt, G., Schwudke, D., Hermoso, J.A., et al. (2014). Structure of the pneumococcal l,d-carboxypeptidase DacB and pathophysiological effects of disabled cell wall hydrolases DacA and DacB. *Mol. Microbiol.* 93, 1183-1206.
- Adam, V. (2014). Phototransformable fluorescent proteins: which one for which application? *Histochem. Cell Biol.* 142, 19-41.
- Agard, N.J., Prescher, J.A., and Bertozzi, C.R. (2004). A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 15046-15047.
- Avery, O.T., and Dubos, R. (1931). The Protective Action of a Specific Enzyme Against Type Iii Pneumococcus Infection in Mice. *J. Exp. Med.* 54, 73-89.
- Avery, O.T., MacLeod, C.M., and McCarty, M. (1944). STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES. *J. Exp. Med.* 79, 137-158.
- Barendt, S.M., Sham, L.-T., and Winkler, M.E. (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. *J. Bacteriol.* 193, 2290-2300.
- Barocchi, M.A., Ries, J., Zogaj, X., Hemsley, C., Albiger, B., Kanth, A., Dahlberg, S., Fernebro, J., Moschioni, M., Massignani, V., et al. (2006). A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2857-2862.
- Barreteau, H., Sosič, I., Turk, S., Humljan, J., Tomašić, T., Zidar, N., Hervé, M., Boniface, A., Peterlin-Mašič, L., Kikelj, D., et al. (2012). MurD enzymes from different bacteria: Evaluation of inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 84, 625-632.
- Bartual, S.G., Straume, D., Stamsås, G.A., Muñoz, I.G., Alfonso, C., Martínez-Ripoll, M., Håvarstein, L.S., and Hermoso, J.A. (2014). Structural basis of PcsB-mediated cell separation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Commun.* 5, 3842.
- Beilharz, K., Nováková, L., Fadda, D., Branny, P., Massidda, O., and Veening, J.-W. (2012). Control of cell division in Streptococcus pneumoniae by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E905-E913.

- Berg, K.H., Stamsas, G.A., Straume, D., and Havarstein, L.S. (2013). Effects of Low PBP2b Levels on Cell Morphology and Peptidoglycan Composition in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J. Bacteriol.* *195*, 4342-4354.
- Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H.F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* *313*, 1642-1645.
- Bi, E.F., and Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* *354*, 161-164.
- Bisson-Filho, A.W., Hsu, Y.-P., Squyres, G.R., Kuru, E., Wu, F., Jukes, C., Sun, Y., Dekker, C., Holden, S., VanNieuwenhze, M.S., et al. (2017). Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science* *355*, 739-743.
- den Blaauwen, T., de Pedro, M.A., Nguyen-Distèche, M., and Ayala, J.A. (2008). Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 321-344.
- Blewett, A.M., Lloyd, A.J., Echalièr, A., Fülöp, V., Dowson, C.G., Bugg, T.D.H., and Roper, D.I. (2004). Expression, purification, crystallization and preliminary characterization of uridine 5'-diphospho-N-acetylmuramoyl L-alanyl-D-glutamate:lysine ligase (MurE) from *Streptococcus pneumoniae* 110K/70. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *60*, 359-361.
- Bonnet, J., Durmort, C., Jacq, M., Mortier-Barrière, I., Campo, N., VanNieuwenhze, M.S., Brun, Y.V., Arthaud, C., Gallet, B., Moriscot, C., et al. (2017). Peptidoglycan O-acetylation is functionally related to cell wall biosynthesis and cell division in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* *106*, 832-846.
- Boyle, D.S., Khattar, M.M., Addinall, S.G., Lutkenhaus, J., and Donachie, W.D. ftsW is an essential cell-division gene in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *24*, 1263-1273.
- Bramkamp, M., Emmins, R., Weston, L., Donovan, C., Daniel, R.A., and Errington, J. (2008). A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. *Mol. Microbiol.* *70*, 1556-1569.
- Brooks, L.R.K., and Mias, G.I. (2018). *Streptococcus pneumoniae*'s Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Front. Immunol.* *9*.
- Bryksin, A.V., and Matsumura, I. (2010). Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *BioTechniques* *48*, 463-465.
- Bui, N.K., Eberhardt, A., Vollmer, D., Kern, T., Bougault, C., Tomasz, A., Simorre, J.-P., and Vollmer, W. (2012). Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*. *Anal. Biochem.* *421*, 657-666.
- Buss, J., Coltharp, C., Huang, T., Pohlmeier, C., Wang, S.-C., Hatem, C., and Xiao, J. (2013). *In vivo* organization of the FtsZ-ring by ZapA and ZapB revealed by

quantitative super-resolution microscopy: PALM reveals ZapA and ZapB organizing FtsZ clusters. *Mol. Microbiol.* **89**, 1099-1120.

Buss, J.A., Peters, N.T., Xiao, J., and Bernhardt, T.G. (2017). ZapA and ZapB form an FtsZ-independent structure at midcell: Cloud-like structures of ZapAB. *Mol. Microbiol.* **104**, 652-663.

Caparrós, M., Pisabarro, A.G., and de Pedro, M.A. (1992a). Effect of D-amino acids on structure and synthesis of peptidoglycan in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 5549-5559.

Caparrós, M., Arán, V., and de Pedro, M.A. (1992b). Incorporation of S-[3H]methyl-D-cysteine into the peptidoglycan of ether-treated cells of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**, 139-146.

Chen, Y., Bjornson, K., Redick, S.D., and Erickson, H.P. (2005). A Rapid Fluorescence Assay for FtsZ Assembly Indicates Cooperative Assembly with a Dimer Nucleus. *Biophys. J.* **88**, 505-514.

Cho, H., McManus, H.R., Dove, S.L., and Bernhardt, T.G. (2011). Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3773-3778.

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

Chung, K.-M., Hsu, H.-H., Yeh, H.-Y., and Chang, B.-Y. (2007). Mechanism of regulation of prokaryotic tubulin-like GTPase FtsZ by membrane protein EzrA. *J. Biol. Chem.* **282**, 14891-14897.

Claessen, D., Emmins, R., Hamoen, L.W., Daniel, R.A., Errington, J., and Edwards, D.H. (2008). Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **68**, 1029-1046.

Cleverley, R.M., Barrett, J.R., Baslé, A., Bui, N.K., Hewitt, L., Solovyova, A., Xu, Z.-Q., Daniel, R.A., Dixon, N.E., Harry, E.J., et al. (2014). Structure and function of a spectrin-like regulator of bacterial cytokinesis. *Nat. Commun.* **5**, 5421.

Coltharp, C., Buss, J., Plumer, T.M., and Xiao, J. (2016). Defining the rate-limiting processes of bacterial cytokinesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E1044-E1053.

Dajkovic, A., Lan, G., Sun, S.X., Wirtz, D., and Lutkenhaus, J. (2008). MinC Spatially Controls Bacterial Cytokinesis by Antagonizing the Scaffolding Function of FtsZ. *Curr. Biol.* **18**, 235-244.

van Dam, V., Sijbrandi, R., Kol, M., Swiezewska, E., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2007). Transmembrane transport of peptidoglycan precursors across model and bacterial membranes. *Mol. Microbiol.* **64**, 1105-1114.

- Daniel, R.A., and Errington, J. (2003). Control of Cell Morphogenesis in Bacteria: Two Distinct Ways to Make a Rod-Shaped Cell. *Cell* 113, 767-776.
- De Las Rivas, B., García, J.L., López, R., and García, P. (2002). Purification and Polar Localization of Pneumococcal LytB, a Putative Endo- β -N-Acetylglucosaminidase: the Chain-Dispersing Murein Hydrolase. *J. Bacteriol.* 184, 4988-5000.
- De Pascale, G., Lloyd, A.J., Schouten, J.A., Gilbey, A.M., Roper, D.I., Dowson, C.G., and Bugg, T.D.H. (2008). Kinetic characterization of lipid II-Ala:alanyl-tRNA ligase (MurN) from *Streptococcus pneumoniae* using semisynthetic aminoacyl-lipid II substrates. *J. Biol. Chem.* 283, 34571-34579.
- Dempsey, G.T., Vaughan, J.C., Chen, K.H., Bates, M., and Zhuang, X. (2011). Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nat. Methods* 8, 1027-1036.
- Den Blaauwen, T., Aarsman, M.E.G., Vischer, N.O.E., and Nanninga, N. (2003). Penicillin-binding protein PBP2 of *Escherichia coli* localizes preferentially in the lateral wall and at mid-cell in comparison with the old cell pole. *Mol. Microbiol.* 47, 539-547.
- Derouaux, A., Sauvage, E., and Terrak, M. (2013). Peptidoglycan Glycosyltransferase Substrate Mimics as Templates for the Design of New Antibacterial Drugs. *Front. Immunol.* 4.
- Domínguez-Escobar, J., Chastanet, A., Crevenna, A.H., Fromion, V., Wedlich-Söldner, R., and Carballido-López, R. (2011). Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science* 333, 225-228.
- Draper, G.C., McLennan, N., Begg, K., Masters, M., and Donachie, W.D. (1998). Only the N-Terminal Domain of FtsK Functions in Cell Division. *J. Bacteriol.* 180, 4621-4627.
- Du, W., Brown, J.R., Sylvester, D.R., Huang, J., Chalker, A.F., So, C.Y., Holmes, D.J., Payne, D.J., and Wallis, N.G. (2000). Two active forms of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase in gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 182, 4146-4152.
- Dubarry, N., and Barre, F.-X. (2010). Fully efficient chromosome dimer resolution in *Escherichia coli* cells lacking the integral membrane domain of FtsK. *EMBO J.* 29, 597-605.
- Duman, R., Ishikawa, S., Celik, I., Strahl, H., Ogasawara, N., Troc, P., Löwe, J., and Hamoen, L.W. (2013). Structural and genetic analyses reveal the protein SepF as a new membrane anchor for the Z ring. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E4601-4610.
- El Mortaji, L., Fenel, D., Vernet, T., and Di Guilmi, A.M. (2012). Association of RrgA and RrgC into the *Streptococcus pneumoniae* Pilus by Sortases C-2 and C-3. *Biochemistry (Mosc.)* 51, 342-352.

- Engholm, D.H., Kilian, M., Goodsell, D.S., Andersen, E.S., and Kjærgaard, R.S. (2017). A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Rev.* *41*, 854-879.
- Ent, F. van den, Izoré, T., Bharat, T.A., Johnson, C.M., and Löwe, J. (2014). Bacterial actin MreB forms antiparallel double filaments. *ELife* *3*, e02634.
- van den Ent, F., Amos, L.A., and Löwe, J. (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* *413*, 39-44.
- Erickson, H.P., and Osawa, M. (2010). Cell division without FtsZ - a variety of redundant mechanisms: Redundant mechanisms for cell division. *Mol. Microbiol.* *78*, 267-270.
- Erickson, H.P., and Osawa, M. (2017). FtsZ Constriction Force - Curved Protofilaments Bending Membranes. *Subcell. Biochem.* *84*, 139-160.
- Erickson, H.P., Taylor, D.W., Taylor, K.A., and Bramhill, D. (1996). Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 519-523.
- Erickson, H.P., Anderson, D.E., and Osawa, M. (2010). FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *74*, 504-528.
- Falk, S.P., and Weisblum, B. (2013). Phosphorylation of the *Streptococcus pneumoniae* cell wall biosynthesis enzyme MurC by a eukaryotic-like Ser/Thr kinase. *FEMS Microbiol. Lett.* *340*, 19-23.
- Fenton, A.K., Mortaji, L.E., Lau, D.T.C., Rudner, D.Z., and Bernhardt, T.G. (2016). CozE is a member of the MreCD complex that directs cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Microbiol.* *2*.
- Fenton, A.K., Manuse, S., Flores-Kim, J., Garcia, P.S., Mercy, C., Grangeasse, C., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z. (2018). Phosphorylation-dependent activation of the cell wall synthase PBP2a in *Streptococcus pneumoniae* by MacP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, 2812-2817.
- Ferrero, R.L., and Lee, A. (1988). Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: comparison with conventional rod-shaped bacteria. *J. Gen. Microbiol.* *134*, 53-59.
- Figueiredo, T.A., Sobral, R.G., Ludovice, A.M., Almeida, J.M.F. de, Bui, N.K., Vollmer, W., Lencastre, H. de, and Tomasz, A. (2012). Identification of Genetic Determinants and Enzymes Involved with the Amidation of Glutamic Acid Residues in the Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. *PLOS Pathog.* *8*, e1002508.
- Filipe, S.R., and Tomasz, A. (2000). Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall muropeptide branching genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 4891-4896.

- Fleurie, A., Cluzel, C., Guiral, S., Freton, C., Galisson, F., Zanella-Cleon, I., Di Guilmi, A.-M., and Grangeasse, C. (2012). Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*: Role of StkP in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* *83*, 746-758.
- Fleurie, A., Lesterlin, C., Manuse, S., Zhao, C., Cluzel, C., Lavergne, J.-P., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Combet, C., Kuru, E., et al. (2014a). MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* *516*, 259-262.
- Fleurie, A., Manuse, S., Zhao, C., Campo, N., Cluzel, C., Lavergne, J.-P., Freton, C., Combet, C., Guiral, S., Soufi, B., et al. (2014b). Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. *PLoS Genet.* *10*, e1004275.
- Formanek, H., and Formanek, S. (1970). Specific Staining for Electron Microscopy of Murein Sacculi of Bacterial Cell Walls. *Eur. J. Biochem.* *17*, 78-84.
- Fu, G., Huang, T., Buss, J., Coltharp, C., Hensel, Z., and Xiao, J. (2010). In vivo structure of the *E. coli* FtsZ-ring revealed by photoactivated localization microscopy (PALM). *PloS One* *5*, e12682.
- García, P., González, M.P., García, E., López, R., and García, J.L. (1999). LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol. Microbiol.* *31*, 1275-1281.
- Gardete, S., Ludovice, A.M., Sobral, R.G., Filipe, S.R., de Lencastre, H., and Tomasz, A. (2004). Role of murE in the Expression of beta-lactam antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *186*, 1705-1713.
- Garner, E.C., Bernard, R., Wang, W., Zhuang, X., Rudner, D.Z., and Mitchison, T. (2011). Coupled, Circumferential Motions of the Cell Wall Synthesis Machinery and MreB Filaments in *B. subtilis*. *Science* *333*, 222-225.
- Georgieva, M., Cattoni, D.I., Fiche, J.-B., Mutin, T., Chamousset, D., and Nollmann, M. (2016). Nanometer resolved single-molecule colocalization of nuclear factors by two-color super resolution microscopy imaging. *Methods* *105*, 44-55.
- Giefing, C., Meinke, A.L., Hanner, M., Henics, T., Minh, D.B., Gelbmann, D., Lundberg, U., Senn, B.M., Schunn, M., Habel, A., et al. (2008). Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J. Exp. Med.* *205*, 117-131.
- Giefing-Kröll, C., Jelencsics, K.E., Reipert, S., and Nagy, E. (2011). Absence of pneumococcal PcsB is associated with overexpression of LysM domain-containing proteins. *Microbiology* *157*, 1897-1909.
- Goffin, C., and Ghuysen, J.-M. (1998). Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic Family of Orthologs and Paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 1079-1093.
- Gram, C. (1884). The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschritte Med.*

- Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *Epidemiol. Amp Infect.* 27, 113-159.
- Guan, F., and Ye, S. (2018). Lateral interactions between protofilaments of the bacterial tubulin homolog FtsZ are essential for cell division. *ELife*.
- Gündoğdu, M.E., Kawai, Y., Pavlendova, N., Ogasawara, N., Errington, J., Scheffers, D.-J., and Hamoen, L.W. (2011). Large ring polymers align FtsZ polymers for normal septum formation. *EMBO J.* 30, 617-626.
- Ha, S., Walker, D., Shi, Y., and Walker, S. (2000). The 1.9 Å crystal structure of *Escherichia coli* MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 9, 1045-1052.
- Haeusser, D.P., Schwartz, R.L., Smith, A.M., Oates, M.E., and Levin, P.A. (2004). EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. *Mol. Microbiol.* 52, 801-814.
- Haeusser, D.P., Garza, A.C., Buscher, A.Z., and Levin, P.A. (2007). The division inhibitor EzrA contains a seven-residue patch required for maintaining the dynamic nature of the medial FtsZ ring. *J. Bacteriol.* 189, 9001-9010.
- Hajduk, I.V., Rodrigues, C.D.A., and Harry, E.J. (2016). Connecting the dots of the bacterial cell cycle: Coordinating chromosome replication and segregation with cell division. *Semin. Cell Dev. Biol.* 53, 2-9.
- Hakenbeck, R., Tornette, S., and Adkinson, N.F. (1987). Interaction of non-lytic beta-lactams with penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 755-760.
- Hamoen, L.W., Meile, J.-C., de Jong, W., Noirot, P., and Errington, J. (2006). SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. *Mol. Microbiol.* 59, 989-999.
- Hansman, D., and Bullen, M. (1967). A resistant pneumococcus. *The Lancet* 264-265.
- Håvarstein, L.S., Coomaraswamy, G., and Morrison, D.A. (1995). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11140-11144.
- Heilemann, M., van de Linde, S., Schüttpelz, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P., and Sauer, M. (2008). Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 6172-6176.
- Henrichsen, J. (1995). Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2759-2762.
- Higgins, M.L., and Shockman, G.D. (1970). Model for Cell Wall Growth of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 101, 643-648.

Higgins, M.L., and Shockman, G.D. (1976). Study of cycle of cell wall assembly in *Streptococcus faecalis* by three-dimensional reconstructions of thin sections of cells. *J. Bacteriol.* *127*, 1346-1358.

Holečková, N., Doubravová, L., Massidda, O., Molle, V., Buriánková, K., Benada, O., Kofroňová, O., Ulrych, A., and Branny, P. (2015). LocZ Is a New Cell Division Protein Involved in Proper Septum Placement in *Streptococcus pneumoniae*. *MBio* *6*, e01700-14.

Holmes, A.R., McNab, R., Millsap, K.W., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Mawdsley, J.L., and Jenkinson, H.F. (2001). The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol. Microbiol.* *41*, 1395-1408.

Höltje, J.-V. (1998). Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 181-203.

Hoskins, J., Matsushima, P., Mullen, D.L., Tang, J., Zhao, G., Meier, T.I., Nicas, T.I., and Jaskunas, S.R. (1999). Gene disruption studies of penicillin-binding proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* *181*, 6552-6555.

Humljan, J., Kotnik, M., Contreras-Martel, C., Blanot, D., Urleb, U., Dessen, A., Šolmajer, T., and Gobec, S. (2008). Novel naphthalene-N-sulfonyl-D-glutamic acid derivatives as inhibitors of MurD, a key peptidoglycan biosynthesis enzyme. *J. Med. Chem.* *51*, 7486-7494.

Hvorup, R.N., Winnen, B., Chang, A.B., Jiang, Y., Zhou, X.-F., and Saier, M.H. (2003). The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *Eur. J. Biochem.* *270*, 799-813.

Im, H., Sharpe, M.L., Strych, U., Davlieva, M., and Krause, K.L. (2011). The crystal structure of alanine racemase from *Streptococcus pneumoniae*, a target for structure-based drug design. *BMC Microbiol.* *11*, 116.

Imhoff, J.F., Petri, R., and Süling, J. (1998). Reclassification of species of the spiral-shaped phototrophic purple non-sulfur bacteria of the α -Proteobacteria: description of the new genera *Phaeospirillum* gen. nov., *Rhodovibrio* gen. nov., *Rhodotalassium* gen. nov. and *Roseospira* gen. nov. as well as transfer of *Rhodospirillum fulvum* to *Phaeospirillum fulvum* comb. nov., of *Rhodospirillum molischianum* to *Phaeospirillum molischianum* comb. nov., of *Rhodospirillum salinarum* to *Rhodovibrio salinarum* comb. nov., of *Rhodospirillum sodomense* to *Rhodovibrio sodomensis* comb. nov., of *Rhodospirillum salexigens* to *Rhodotalassium salexigens* comb. nov. and of *Rhodospirillum mediosalinum* to *Roseospira mediosalina* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *48*, 793-798.

Inoue, A., Murata, Y., Takahashi, H., Tsuji, N., Fujisaki, S., and Kato, J. (2008). Involvement of an Essential Gene, *mviN*, in Murein Synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *190*, 7298-7301.

INSV (2017). Résistance aux anti-infectieux. [Http://www.institut.santepubliquefrance.fr/Dossiers-Themat.-Infect.-Aux-Anti-Infect.-Par-Pathog.](http://www.institut.santepubliquefrance.fr/Dossiers-Themat.-Infect.-Aux-Anti-Infect.-Par-Pathog.)

- Jacq, M., Adam, V., Bourgeois, D., Moriscot, C., Di Guilmi, A.-M., Vernet, T., and Morlot, C. (2015). Remodeling of the Z-Ring Nanostructure during the *Streptococcus pneumoniae* Cell Cycle Revealed by Photoactivated Localization Microscopy. *MBio* 6.
- Jacq, M., Arthaud, C., Manuse, S., Mercy, C., Bellard, L., Peters, K., Gallet, B., Galindo, J., Doan, T., Vollmer, W., et al. (2018). The cell wall hydrolase Pmp23 is important for assembly and stability of the division ring in *Streptococcus pneumoniae*. *Sci. Rep.* 8.
- Janoff, E.N., Rubins, J.B., Fasching, C., Charboneau, D., Rahkola, J.T., Plaut, A.G., and Weiser, J.N. (2014). Pneumococcal IgA1 Protease Subverts Specific Protection By Human IgA1. *Mucosal Immunol.* 7, 249-256.
- Jenkins, C., Samudrala, R., Anderson, I., Hedlund, B.P., Petroni, G., Michailova, N., Pinel, N., Overbeek, R., Rosati, G., and Staley, J.T. (2002). Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 17049-17054.
- Johnsborg, O., and Håvarstein, L.S. (2009). Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 627-642.
- Jones, L.J., Carballido-López, R., and Errington, J. (2001). Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* 104, 913-922.
- Jun, S., and Mulder, B. (2006). Entropy-driven spatial organization of highly confined polymers: Lessons for the bacterial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 12388-12393.
- Kaguni, J.M. (2006). DnaA: Controlling the Initiation of Bacterial DNA Replication and More. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 351-371.
- Kahan, F.M., Kahan, J.S., Cassidy, P.J., and Kropp, H. (1974). The Mechanism of Action of Fosfomycin (phosphonomycin). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 235, 364-386.
- Kalina, A.P. (1970). The taxonomy and nomenclature of enterococci.
- Katayama, T., Ozaki, S., Keyamura, K., and Fujimitsu, K. (2010). Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and *oriC*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 163-170.
- Kawai, Y., Asai, K., and Errington, J. (2009). Partial functional redundancy of MreB isoforms, MreB, Mbl and MreBH, in cell morphogenesis of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 73, 719-731.
- Kell, C.M., Sharma, U.K., Dowson, C.G., Town, C., Balganesh, T.S., and Spratt, B.G. (1993). Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 106, 171-175.
- Khare, B., and Narayana, S.V.L. (2017). Pilus biogenesis of Gram-positive bacteria: Roles of sortases and implications for assembly. *Protein Sci.* 26, 1458-1473.

Klugman, K.P., and Lonks, J.R. (2005). Hidden Epidemic of Macrolide-resistant Pneumococci. *Emerg. Infect. Dis.* *11*, 802-807.

Kocaoglu, O., Calvo, R.A., Sham, L.-T., Cozy, L.M., Lanning, B.R., Francis, S., Winkler, M.E., Kearns, D.B., and Carlson, E.E. (2012). Selective Penicillin-Binding Protein Imaging Probes Reveal Substructure in Bacterial Cell Division. *ACS Chem. Biol.* *7*, 1746-1753.

Kolb, H., Finn, M., and Sharpless, K. (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions - Kolb - 2001 - *Angewandte Chemie International Edition* - Wiley Online Library.

Komeili, A. (2006). Magnetosomes Are Cell Membrane Invaginations Organized by the Actin-Like Protein MamK. *Science* *311*, 242-245.

Kotnik, M., Humljan, J., Contreras-Martel, C., Oblak, M., Kristan, K., Hervé, M., Blanot, D., Urleb, U., Gobec, S., Dessen, A., et al. (2007). Structural and Functional Characterization of Enantiomeric Glutamic Acid Derivatives as Potential Transition State Analogue Inhibitors of MurD Ligase. *J. Mol. Biol.* *370*, 107-115.

Kouidmi, I., Levesque, R.C., and Paradis-Bleau, C. The biology of Mur ligases as an antibacterial target. *Mol. Microbiol.* *94*, 242-253.

Kruse, T., Bork-Jensen, J., and Gerdes, K. (2004). The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex: MreBCD proteins form an essential membrane complex. *Mol. Microbiol.* *55*, 78-89.

Kuru, E., Hughes, H.V., Brown, P.J., Hall, E., Tekkam, S., Cava, F., de Pedro, M.A., Brun, Y.V., and VanNieuwenhze, M.S. (2012). In Situ Probing of Newly Synthesized Peptidoglycan in Live Bacteria with Fluorescent D -Amino Acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* *51*, 12519-12523.

Kuru, E., Tekkam, S., Hall, E., Brun, Y.V., and VanNieuwenhze, M.S. (2015). Synthesis of fluorescent D-amino acids (FDAAs) and their use for probing peptidoglycan synthesis and bacterial growth in situ. *Nat. Protoc.* *10*, 33-52.

Kysela, D.T., Randich, A.M., Caccamo, P.D., and Brun, Y.V. (2016). Diversity Takes Shape: Understanding the Mechanistic and Adaptive Basis of Bacterial Morphology. *PLOS Biol.* *14*, e1002565.

Lacks, S., and Hotchkiss, R.D. (1960). A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochim. Biophys. Acta* *39*, 508-518.

Land, A.D., Tsui, H.-C.T., Kocaoglu, O., Vella, S.A., Shaw, S.L., Keen, S.K., Sham, L.-T., Carlson, E.E., and Winkler, M.E. (2013). Requirement of essential Pbp2x and GpsB for septal ring closure in *Streptococcus pneumoniae* D39: Essential role of GpsB in pneumococcal division. *Mol. Microbiol.* *90*, 939-955.

Land, A.D., Luo, Q., and Levin, P.A. (2014). Functional domain analysis of the cell division inhibitor EzrA. *PloS One* *9*, e102616.

- Lara, B., Rico, A.I., Petruzzelli, S., Santona, A., Dumas, J., Biton, J., Vicente, M., Mingorance, J., and Massidda, O. (2004). Cell division in cocci: localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein: FtsA in *Streptococcus pneumoniae* division. *Mol. Microbiol.* *55*, 699-711.
- Larsen, R.A., Cusumano, C., Fujioka, A., Lim-Fong, G., Patterson, P., and Pogliano, J. (2007). Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis*. *Genes Dev.* *21*, 1340-1352.
- Levin, P.A., Kurtser, I.G., and Grossman, A.D. (1999). Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 9642-9647.
- Li, Y., Hsin, J., Zhao, L., Cheng, Y., Shang, W., Huang, K.C., Wang, H.-W., and Ye, S. (2013). FtsZ protofilaments use a hinge-opening mechanism for constrictive force generation. *Science* *341*.
- Li, Y., Shao, S., Xu, X., Su, X., Sun, Y., and Wei, S. (2017). MapZ forms a stable ring structure that acts as a nano-track for FtsZ treadmilling in *Streptococcus mutans*.
- Liechti, G., Kuru, E., Hall, E., Kalinda, A., Brun, Y.V., VanNieuwenhze, M., and Maurelli, A.T. (2014). A new metabolic cell wall labeling method reveals peptidoglycan in *Chlamydia trachomatis*. *Nature* *506*, 507-510.
- van de Linde, S., Löschberger, A., Klein, T., Heidbreder, M., Wolter, S., Heilemann, M., and Sauer, M. (2011). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat. Protoc.* *6*, 991-1009.
- Liu, W., Tan, M., Zhang, C., Xu, Z., Li, L., and Zhou, R. (2018). Functional characterization of murB-potABCD operon for polyamine uptake and peptidoglycan synthesis in *Streptococcus suis*. *Microbiol. Res.* *207*, 177-187.
- Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* *16*, 161-168.
- Lloyd, A.J., Gilbey, A.M., Blewett, A.M., Pascale, G.D., Zoeiby, A.E., Levesque, R.C., Catherwood, A.C., Tomasz, A., Bugg, T.D.H., Roper, D.I., et al. (2008). Characterization of tRNA-dependent Peptide Bond Formation by MurM in the Synthesis of *Streptococcus pneumoniae* Peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* *283*, 6402-6417.
- Loose, M., and Mitchison, T.J. (2014). The bacterial cell division proteins FtsA and FtsZ self-organize into dynamic cytoskeletal patterns. *Nat. Cell Biol.* *16*, 38-46.
- Löwe, J., and Amos, L.A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* *391*, 203-206.

Lund, V.A., Wacnik, K., Turner, R.D., Cotterell, B.E., Walther, C.G., Fenn, S.J., Grein, F., Wollman, A.J., Leake, M.C., Olivier, N., et al. (2018). Molecular coordination of *Staphylococcus aureus* cell division. *ELife* 7.

Lutkenhaus, J. (2007). Assembly Dynamics of the Bacterial MinCDE System and Spatial Regulation of the Z Ring. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 539-562.

Maestro, B., Novaková, L., Heseck, D., Lee, M., Leyva, E., Mobashery, S., Sanz, J.M., and Branny, P. (2011). Recognition of peptidoglycan and β -lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae*. *FEBS Lett.* 585, 357-363.

Manat, G., Roure, S., Auger, R., Bouhss, A., Barreteau, H., Mengin-Lecreulx, D., and Touzé, T. (2014). Deciphering the Metabolism of Undecaprenyl-Phosphate: The Bacterial Cell-Wall Unit Carrier at the Membrane Frontier. *Microb. Drug Resist.* 20, 199-214.

Männik, J., Castillo, D.E., Yang, D., Siopsis, G., and Männik, J. (2016). The role of MatP, ZapA and ZapB in chromosomal organization and dynamics in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 44, 1216-1226.

Manuse, S., Jean, N.L., Guinot, M., Lavergne, J.-P., Laguri, C., Bougault, C.M., VanNieuwenhze, M.S., Grangeasse, C., and Simorre, J.-P. (2016). Structure-function analysis of the extracellular domain of the pneumococcal cell division site positioning protein MapZ. *Nat. Commun.* 7, 12071.

Manzano, C., Contreras-Martel, C., El Mortaji, L., Izoré, T., Fenel, D., Vernet, T., Schoehn, G., Di Guilmi, A.M., and Dessen, A. (2008). Sortase-mediated pilus fiber biogenesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Struct. Lond. Engl.* 1993 16, 1838-1848.

Massey, T.H., Mercogliano, C.P., Yates, J., Sherratt, D.J., and Löwe, J. (2006). Double-Stranded DNA Translocation: Structure and Mechanism of Hexameric FtsK. *Mol. Cell* 23, 457-469.

Massidda, O., Nováková, L., and Vollmer, W. (2013). From models to pathogens: how much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell. *Environ. Microbiol.*

Matias, V.R.F., Al-Amoudi, A., Dubochet, J., and Beveridge, T.J. (2003). Cryo-Transmission Electron Microscopy of Frozen-Hydrated Sections of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 185, 6112-6118.

Matsushashi, M. (1994). Chapter 4 Utilization of lipid-linked precursors and the formation of peptidoglycan in the process of cell growth and division: membrane enzymes involved in the final steps of peptidoglycan synthesis and the mechanism of their regulation. In *New Comprehensive Biochemistry*, J.-M. Ghuyssen, and R. Hakenbeck, eds. (Elsevier), pp. 55-71.

Meeske, A.J., Sham, L.-T., Kimsey, H., Koo, B.-M., Gross, C.A., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z. (2015). MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 6437-6442.

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

Milewski, S. (2002). Glucosamine-6-phosphate synthase—the multi-facets enzyme. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1597, 173-192.

Mohammadi, T., van Dam, V., Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., Diepeveen-de Bruin, M., Nguyen-Distèche, M., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2011). Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J.* 30, 1425-1432.

Morales Angeles, D., Liu, Y., Hartman, A.M., Borisova, M., de Sousa Borges, A., de Kok, N., Beilharz, K., Veening, J.-W., Mayer, C., Hirsch, A.K.H., et al. (2017). Pentapeptide-rich peptidoglycan at the *Bacillus subtilis* cell-division site: unprocessed PG at *B. subtilis* division sites. *Mol. Microbiol.*

Morgenstein, R.M., Bratton, B.P., Nguyen, J.P., Ouzounov, N., Shaevitz, J.W., and Gitai, Z. (2015). RodZ links MreB to cell wall synthesis to mediate MreB rotation and robust morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 12510-12515.

Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003). Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol. Microbiol.* 50, 845-855.

Morlot, C., Noirclerc-Savoie, M., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2004). The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 51, 1641-1648.

Morlot, C., Pernot, L., Gouellec, A.L., Guilmi, A.M.D., Vernet, T., Dideberg, O., and Dessen, A. (2005). Crystal Structure of a Peptidoglycan Synthesis Regulatory Factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 280, 15984-15991.

Morlot, C., Bayle, L., Jacq, M., Fleurie, A., Tourcier, G., Galisson, F., Vernet, T., Grangeasse, C., and Di Guilmi, A.M. (2013). Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in *Streptococcus pneumoniae* R6 morphogenesis: Interaction of pneumococcal PBP2x and StkP. *Mol. Microbiol.* n/a-n/a.

Moscoso, M., Garcia, E., and Lopez, R. (2006). Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. - PubMed - NCBI.

Moynihan, P.J., and Clarke, A.J. (2010). O-Acetylation of Peptidoglycan in Gram-negative Bacteria IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PEPTIDOGLYCAN O-ACETYLTRANSFERASE IN NEISSERIA GONORRHOEA. *J. Biol. Chem.* 285, 13264-13273.

Müller-Jensen, J., Jensen, R.B., we, J.L., and Gerdes, K. Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. 9.

Münch, D., Roemer, T., Lee, S.H., Engeser, M., Sahl, H.G., and Schneider, T. (2012). Identification and in vitro Analysis of the GatD/MurT Enzyme-Complex Catalyzing Lipid II Amidation in *Staphylococcus aureus*. *PLOS Pathog.* 8, e1002509.

Mura, A., Fadda, D., Perez, A.J., Danforth, M.L., Musu, D., Rico, A.I., Krupka, M., Denapaite, D., Tsui, H.-C.T., Winkler, M.E., et al. (2017). Roles of the Essential Protein FtsA in Cell Growth and Division in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 199, e00608-16.

Neuhaus, F.C., and Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 67, 686-723.

Ng, W.-L., Kazmierczak, K.M., and Winkler, M.E. (2004). Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator: Defective cell wall synthesis in pcsB mutants. *Mol. Microbiol.* 53, 1161-1175.

Nicolas, E., Upton, A.L., Uphoff, S., Henry, O., Badrinarayanan, A., and Sherratt, D. (2014). The SMC Complex MukBEF Recruits Topoisomerase IV to the Origin of Replication Region in Live *Escherichia coli*. *MBio* 5, e01001-13.

Nogales, E., Wolf, S.G., and Downing, K.H. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391, 199-203.

Nováková, L., Sasková, L., Pallová, P., Janecek, J., Novotná, J., Ulrych, A., Echenique, J., Trombe, M.-C., and Branny, P. (2005). Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. *FEBS J.* 272, 1243-1254.

Osawa, M., Anderson, D.E., and Erickson, H.P. (2008). Reconstitution of Contractile FtsZ Rings in Liposomes. *Science* 320, 792-794.

Ovesný, M., Křížek, P., Borkovec, J., Švindrych, Z., and Hagen, G.M. (2014). ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. *Bioinformatics* 30, 2389-2390.

Pagliero, E., B, D., C, F., O, D., T, V., and Am, D.G. (2008). The Inactivation of a New Peptidoglycan Hydrolase Pmp23 Leads to Abnormal Septum Formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Open Microbiol. J.* 2, 107-114.

Paradis-Bleau, C., Sanschagrin, F., and Levesque, R.C. (2005). Peptide inhibitors of the essential cell division protein FtsA. *Protein Eng. Des. Sel.* 18, 85-91.

Pasteur, L. (1881). Sur une maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de rage". *Comptes Rendus Académie Sci. Paris* 159.

Pease, P.J., Levy, O., Cost, G.J., Gore, J., Ptacin, J.L., Sherratt, D., Bustamante, C., and Cozzarelli, N.R. (2005). Sequence-Directed DNA Translocation by Purified FtsK. *Science* 307, 586-590.

- de Pedro, M.A., Quintela, J.C., Höltje, J.V., and Schwarz, H. (1997). Murein segregation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *179*, 2823-2834.
- Perdih, A., Hrast, M., Barreteau, H., Gobec, S., Wolber, G., and Solmajer, T. (2014). Benzene-1,3-dicarboxylic acid 2,5-dimethylpyrrole derivatives as multiple inhibitors of bacterial Mur ligases (MurC-MurF). *Bioorg. Med. Chem.* *22*, 4124-4134.
- Perkins, H.R., and Nieto, M. The Chemical Basis for the Action of the Vancomycin Group of Antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *235*, 348-363.
- Philippe, J., Vernet, T., and Zapun, A. (2014). The Elongation of Ovococci. *Microb. Drug Resist.* *20*, 215-221.
- Philippe, J., Gallet, B., Morlot, C., Denapaite, D., Hakenbeck, R., Chen, Y., Vernet, T., and Zapun, A. (2015a). Mechanism of β -Lactam Action in *Streptococcus pneumoniae*: the Piperacillin Paradox. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 609-621.
- Philippe, J., Gallet, B., Morlot, C., Denapaite, D., Hakenbeck, R., Chen, Y., Vernet, T., and Zapun, A. (2015b). Mechanism of β -lactam action in *Streptococcus pneumoniae*: the piperacillin paradox. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 609-621.
- Pilhofer, M., Aistleitner, K., Biboy, J., Gray, J., Kuru, E., Hall, E., Brun, Y.V., VanNieuwenhze, M.S., Vollmer, W., Horn, M., et al. (2013). Discovery of chlamydial peptidoglycan reveals bacteria with murein sacculi but without FtsZ. *Nat. Commun.* *4*, 2856.
- Popp, D., Iwasa, M., Narita, A., Erickson, H.P., and Maéda, Y. (2009). FtsZ Condensates: An In Vitro Electron Microscopy Study. *Biopolymers* *91*, 340-350.
- Prosser, G.A., and de Carvalho, L.P.S. (2013). Kinetic mechanism and inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* D -alanine: D -alanine ligase by the antibiotic D -cycloserine. *FEBS J.* *280*, 1150-1166.
- van Raaphorst, R., Kjos, M., and Veening, J.-W. (2017). Chromosome segregation drives division site selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, E5959-E5968.
- Radkov, A.D., Hsu, Y.-P., Booher, G., and VanNieuwenhze, M.S. (2018). Imaging Bacterial Cell Wall Biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* *87*, 991-1014.
- Ramos-Sevillano, E., Moscoso, M., García, P., García, E., and Yuste, J. (2011). Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* *6*, e23626.
- Ren, B., Szalai, A.J., Thomas, O., Hollingshead, S.K., and Briles, D.E. (2003). Both Family 1 and Family 2 PspA Proteins Can Inhibit Complement Deposition and Confer Virulence to a Capsular Serotype 3 Strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* *71*, 75-85.
- Rico-Lastres, P., Díez-Martínez, R., Iglesias-Bexiga, M., Bustamante, N., Aldridge, C., Heseck, D., Lee, M., Mobashery, S., Gray, J., Vollmer, W., et al. (2015). Substrate

recognition and catalysis by LytB, a pneumococcal peptidoglycan hydrolase involved in virulence. *Sci. Rep.* 5.

Rodrigues, C.D.A., and Harry, E.J. (2012). The Min system and nucleoid occlusion are not required for identifying the division site in *Bacillus subtilis* but ensure its efficient utilization. *PLoS Genet.* 8, e1002561.

Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V., and Sharpless, K.B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2596-2599.

Rued, B.E., Zheng, J.J., Mura, A., Tsui, H.-C.T., Boersma, M.J., Mazny, J.L., Corona, F., Perez, A.J., Fadda, D., Doubravová, L., et al. (2017). Suppression and synthetic-lethal genetic relationships of Δ *gps B* mutations indicate that GpsB mediates protein phosphorylation and penicillin-binding protein interactions in *S. treptococcus pneumoniae* D39: Functions of essential pneumococcal GpsB in division. *Mol. Microbiol.* 103, 931-957.

Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 234-258.

Scheffers, D.-J., Jones, L.J.F., and Errington, J. (2004). Several distinct localization patterns for penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 51, 749-764.

Schleifer, K.H., and Kilpper-Bälz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 34, 31-34.

Sham, L.-T., Barendt, S.M., Kopecky, K.E., and Winkler, M.E. (2011). Essential PcsB putative peptidoglycan hydrolase interacts with the essential FtsXSpn cell division protein in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, E1061-E1069.

Sham, L.-T., Tsui, H.-C.T., Land, A.D., Barendt, S.M., and Winkler, M.E. (2012). Recent advances in pneumococcal peptidoglycan biosynthesis suggest new vaccine and antimicrobial targets. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 194-203.

Sham, L.-T., Butler, E.K., Lebar, M.D., Kahne, D., Bernhardt, T.G., and Ruiz, N. (2014). Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science* 345, 220-222.

Shaper, M., Hollingshead, S.K., Benjamin, W.H., and Briles, D.E. (2004). PspA Protects *Streptococcus pneumoniae* from Killing by Apolactoferrin, and Antibody to PspA Enhances Killing of Pneumococci by Apolactoferrin. *Infect. Immun.* 72, 5031-5040.

Shcherbakova, D.M., Sengupta, P., Lippincott-Schwartz, J., and Verkhusha, V.V. (2014). Photocontrollable Fluorescent Proteins for Superresolution Imaging. *Annu. Rev. Biophys.* 43, 303-329.

- Shim, S.-H., Xia, C., Zhong, G., Babcock, H.P., Vaughan, J.C., Huang, B., Wang, X., Xu, C., Bi, G.-Q., and Zhuang, X. (2012). Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 13978-13983.
- Shuldiner, A.R., Scott, L.A., and Roth, J. (1990). PCR-induced (ligase-free) subcloning: a rapid reliable method to subclone polymerase chain reaction (PCR) products. *Nucleic Acids Res.* *18*, 1920.
- Si, F., Busiek, K., Margolin, W., and Sun, S.X. (2013). Organization of FtsZ Filaments in the Bacterial Division Ring Measured from Polarized Fluorescence Microscopy. *Biophys. J.* *105*, 1976-1986.
- Singh, J.K., Makde, R.D., Kumar, V., and Panda, D. (2008). SepF Increases the Assembly and Bundling of FtsZ Polymers and Stabilizes FtsZ Protofilaments by Binding along Its Length. *J. Biol. Chem.* *283*, 31116-31124.
- Šink, R., Kovač, A., Tomašić, T., Rupnik, V., Boniface, A., Bostock, J., Chopra, I., Blanot, D., Mašič, L.P., Gobec, S., et al. Synthesis and Biological Evaluation of N-Acylhydrazones as Inhibitors of MurC and MurD Ligases. *ChemMedChem* *3*, 1362-1370.
- Stamsås, G.A., Straume, D., Winther, A.R., Kjos, M., Frantzen, C.A., and Håvarstein, L.S. Identification of EloR (Spr1851) as a regulator of cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* *105*, 954-967.
- Steele, V.R., Bottomley, A.L., Garcia-Lara, J., Kasturiarachchi, J., and Foster, S.J. (2011). Multiple essential roles for EzrA in cell division of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* *80*, 542-555.
- Straume, D., Stamsås, G.A., Berg, K.H., Salehian, Z., and Håvarstein, L.S. (2017). Identification of pneumococcal proteins that are functionally linked to penicillin-binding protein 2b (PBP2b): Identification of PBP2b accessory proteins. *Mol. Microbiol.* *103*, 99-116.
- Strauss, M.P., Liew, A.T.F., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Monahan, L.G., and Harry, E.J. (2012). 3D-SIM super resolution microscopy reveals a bead-like arrangement for FtsZ and the division machinery: implications for triggering cytokinesis. *PLoS Biol.* *10*, e1001389.
- Stricker, J., Maddox, P., Salmon, E.D., and Erickson, H.P. (2002). Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 3171-3175.
- Sung, C.K., Li, H., Claverys, J.P., and Morrison, D.A. (2001). An rpsL cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 5190-5196.
- Szwedziak, P., Wang, Q., Freund, S.M., and Löwe, J. (2012). FtsA forms actin-like protofilaments: FtsA forms actin-like protofilaments. *EMBO J.* *31*, 2249-2260.

Todorova, K., Maurer, P., Rieger, M., Becker, T., Bui, N.K., Gray, J., Vollmer, W., and Hakenbeck, R. (2015). Transfer of penicillin resistance from *Streptococcus oralis* to *Streptococcus pneumoniae* identifies murE as resistance determinant. *Mol. Microbiol.* *97*, 866-880.

Tomašić, T., Kovač, A., Simčić, M., Blanot, D., Grdadolnik, S.G., Gobec, S., Kikelj, D., and Peterlin, M. (2011). Novel 2-thioxothiazolidin-4-one inhibitors of bacterial MurD ligase targeting d-Glu- and diphosphate-binding sites. *Eur. J. Med. Chem.* *46*, 3964-3975.

Tomasz, A., Jamieson, J.D., and Ottolenghi, E. (1964). THE FINE STRUCTURE OF DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE. *J. Cell Biol.* *22*, 453-467.

Tornøe, C.W., Christensen, C., and Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* *67*, 3057-3064.

Treuner-Lange, A., Aguiluz, K., Does, C. der, Gómez-Santos, N., Harms, A., Schumacher, D., Lenz, P., Hoppert, M., Kahnt, J., Muñoz-Dorado, J., et al. (2013). PomZ, a ParA-like protein, regulates Z-ring formation and cell division in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* *87*, 235-253.

Tsui, H.-C.T., Boersma, M.J., Vella, S.A., Kocaoglu, O., Kuru, E., Peceny, J.K., Carlson, E.E., VanNieuwenhze, M.S., Brun, Y.V., Shaw, S.L., et al. (2014a). Pbp2x localizes separately from Pbp2b and other peptidoglycan synthesis proteins during later stages of cell division of *S. treptococcus pneumoniae* D39: Separation of pneumococcal Pbp2x from Pbp2b at septa. *Mol. Microbiol.* *94*, 21-40.

Tsui, H.-C.T., Boersma, M.J., Vella, S.A., Kocaoglu, O., Kuru, E., Peceny, J.K., Carlson, E.E., VanNieuwenhze, M.S., Brun, Y.V., Shaw, S.L., et al. (2014b). Pbp2x localizes separately from Pbp2b and other peptidoglycan synthesis proteins during later stages of cell division of *S. treptococcus pneumoniae* D39: Separation of pneumococcal Pbp2x from Pbp2b at septa. *Mol. Microbiol.* *94*, 21-40.

Tsui, H.-C.T., Zheng, J.J., Magallon, A.N., Ryan, J.D., Yunck, R., Rued, B.E., Bernhardt, T.G., and Winkler, M.E. (2016). Suppression of a deletion mutation in the gene encoding essential PBP2b reveals a new lytic transglycosylase involved in peripheral peptidoglycan synthesis in *S. treptococcus pneumoniae* D39: Characterization of pneumococcal MltG in PG synthesis. *Mol. Microbiol.* *100*, 1039-1065.

Turk, S., Hrast, M., Sosi, I., Barreteau, H., Mengin-Lecreux, D., Blanot, D., and Gobec, S. (2013). Biochemical Characterization of MurF from *Streptococcus pneumoniae* and the Identification of a New MurF Inhibitor Through Ligand-based Virtual Screening. *Acta Chim Slov* *6*.

Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A., and Vollmer, W. (2011). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat. Rev. Microbiol.* *10*, 123-136.

- Vats, P., Shih, Y.-L., and Rothfield, L. (2009). Assembly of the MreB-associated cytoskeletal ring of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 72, 170-182.
- Wang, L., and Lutkenhaus, J. FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. *Mol. Microbiol.* 29, 731-740.
- Wegel, E., Göhler, A., Lagerholm, B.C., Wainman, A., Uphoff, S., Kaufmann, R., and Dobbie, I.M. (2016). Imaging cellular structures in super-resolution with SIM, STED and Localisation Microscopy: A practical comparison. *Sci. Rep.* 6.
- Whatmore, A.M., and Reed, R.H. (1990). Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K⁺ in turgor regulation. *J. Gen. Microbiol.* 136, 2521-2526.
- Wheeler, R., Mesnage, S., Boneca, I.G., Hobbs, J.K., and Foster, S.J. (2011). Super-resolution microscopy reveals cell wall dynamics and peptidoglycan architecture in ovococcal bacteria: Ovococcal peptidoglycan architecture and dynamics. *Mol. Microbiol.* 82, 1096-1109.
- Willemse, J., Borst, J.W., de Waal, E., Bisseling, T., and van Wezel, G.P. (2011). Positive control of cell division: FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of *Streptomyces*. *Genes Dev.* 25, 89-99.
- Winslow, and Broadhurst (1920). *The Families and Genera of the Bacteria: Final Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types.*
- World Health Organization (2016). *Pneumonia.*
- Wu, L.J., Ishikawa, S., Kawai, Y., Oshima, T., Ogasawara, N., and Errington, J. (2009). Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *EMBO J.* 28, 1940-1952.
- Xu, Q., Chiu, H.-J., Farr, C.L., Jaroszewski, L., Knuth, M.W., Miller, M.D., Lesley, S.A., Godzik, A., Elsliger, M.-A., Deacon, A.M., et al. (2014). Structures of a bifunctional cell wall hydrolase CwlT containing a novel bacterial lysozyme and an NlpC/P60 DL-endopeptidase. *J. Mol. Biol.* 426, 169-184.
- Yang, D.C., Peters, N.T., Parzych, K.R., Uehara, T., Markovski, M., and Bernhardt, T.G. (2011). An ATP-binding cassette transporter-like complex governs cell-wall hydrolysis at the bacterial cytokinetic ring. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, E1052-1060.
- Yang, X., Lyu, Z., Miguel, A., McQuillen, R., Huang, K.C., and Xiao, J. (2017). GTPase activity-coupled treadmilling of the bacterial tubulin FtsZ organizes septal cell wall synthesis. *Science* 355, 744-747.
- Yother, J. (2011). Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and Other Bacteria: Paradigms for Polysaccharide Biosynthesis and Regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 563-581.
- Yunck, R., Cho, H., and Bernhardt, T.G. (2016). Identification of MltG as a potential terminase for peptidoglycan polymerization in bacteria. *Mol. Microbiol.* 99, 700-718.

Zapun, A., Vernet, T., and Pinho, M.G. (2008). The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 345-360.

Zapun, A., Philippe, J., Abrahams, K.A., Signor, L., Roper, D.I., Breukink, E., and Vernet, T. (2013). *In vitro* Reconstitution of Peptidoglycan Assembly from the Gram-Positive Pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *ACS Chem. Biol.* 8, 2688-2696.

Zhang, J., Yang, Y.-H., Jiang, Y.-L., Zhou, C.-Z., and Chen, Y. (2015). Structural and biochemical analyses of the *Streptococcus pneumoniae* L,D-carboxypeptidase DacB. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 71, 283-292.

Zhang, J., Liu, J., Ling, J., Tong, Z., Fu, Y., and Liang, M. (2016). Inactivation of glutamate racemase (Murl) eliminates virulence in *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Res.* 186-187, 1-8.

Zidar, N., Tomašić, T., Šink, R., Rupnik, V., Kovač, A., Turk, S., Patin, D., Blanot, D., Contreras, M., Dessen, A., et al. (2010). Discovery of novel 5-benzylidenerhodanine and 5-benzylidenethiazolidine-2, 4-dione inhibitors of MurD ligase. *J. Med. Chem.* 53, 6584-6594.

Zoeiby, A.E., Sanschagrín, F., and Levesque, R.C. (2003). Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol. Microbiol.* 47, 1-12.

Zucchini, L., Mercy, C., Garcia, P.S., Cluzel, C., Gueguen-Chaignon, V., Galisson, F., Freton, C., Guiral, S., Brochier-Armanet, C., Gouet, P., et al. (2018). PASTA repeats of the protein kinase StkP interconnect cell constriction and separation of *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Microbiol.* 3, 197-209.