



**HAL**  
open science

# Etude structurale de PBP3 et localisation des six “ Penicillin-Binding Proteins ” de *Streptococcus pneumoniae*: implication dans la croissance et la division bactérienne.

Cécile Morlot

► **To cite this version:**

Cécile Morlot. Etude structurale de PBP3 et localisation des six “ Penicillin-Binding Proteins ” de *Streptococcus pneumoniae*: implication dans la croissance et la division bactérienne.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2003. Français. NNT : . tel-00349752

**HAL Id: tel-00349752**

**<https://theses.hal.science/tel-00349752>**

Submitted on 4 Jan 2009

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

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

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I**

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**

**Discipline : Biologie**

Présentée et soutenue publiquement par

**Cécile MORLOT**

Le 17 Novembre 2003

**Etude structurale de PBP3 et localisation des six  
« Penicillin-Binding Proteins » de *Streptococcus pneumoniae* :  
Implication dans la croissance et la division bactérienne**

**Composition du jury**

<b>Président</b>	<b>M. Johannes GEISELMANN</b>
<b>Rapporteur</b>	<b>Mme. Paulette CHARLIER</b>
<b>Rapporteur</b>	<b>M. Jean VAN-HEIJENOORT</b>
<b>Examineur</b>	<b>M. Jean-Michel MASSON</b>
<b>Examineur</b>	<b>M. Otto DIDEBERG</b>
<b>Directeur de thèse</b>	<b>M. Thierry VERNET</b>

**Thèse préparée au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules de  
l'Institut de Biologie Structurale *Jean-Pierre Ebel***



Aux frises de mon père,

A tout l'amour de ma mère,





# REMERCIEMENTS

J'exprime toute ma gratitude à Thierry Vernet pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour son enthousiasme et pour sa confiance en mon travail qui m'ont permis de donner une orientation très personnelle à ma thèse.

Je suis très reconnaissante envers Otto Dideberg qui m'a permis de découvrir la cristallographie et qui a porté un intérêt constant à mes travaux.

J'adresse tous mes remerciements à Madame Paulette Charlier de l'Université de Liège et Messieurs Jean van Heijenoort de l'Université de Paris-sud, Jean-Michel Masson de l'INSA de Toulouse et Johannes Geiselmann de l'Université de Grenoble pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail.

Un immense merci à André Zapun pour sa réflexion de qualité, ses conseils avisés concernant mon travail et son aide précieuse à la rédaction des publications.

Je remercie très particulièrement Andréa Dessen pour son formidable soutien et son enthousiasme inépuisable. Sans elle, les cristaux de PBP3 auraient certainement eu raison de ma persévérance.

Lucille Pernot restera toujours ma grande magicienne, toujours disponible et très compétente. Merci encore Lucille pour ton phasage.

Je remercie chaleureusement Anne-Marie Di Guilmi pour son amitié, sa disponibilité et pour tout ce qu'elle m'a appris sur les PBPs.

Merci à Danielle Gulino pour son soutien constant et ses conseils.

Je suis très reconnaissante envers Ina Attree-Delic et toutes les personnes du DBMS qui m'ont donné accès aux microscopes à fluorescence.

Je tiens à dire un grand merci à Richard Kahn pour son aide experte au cours des longues nuits passées sur BM30 à tenter de phaser les données de PBP3. Merci également à Eric Girard qui m'a redonné espoir avec le Gadolinium, et à Max Nanao qui m'a beaucoup appris sur les techniques de phasage.

J'exprime toute mon amitié aux thésards, post-docs et étudiants du LIM, du LCM et aux membres de l'IBS ; Marjo, Steph, Laurent, Bastien, Estelle, nos pauses café vont me manquer !

Seb, tu sais tout ce que je te dois, un merci ne suffirait pas ...



## CONTRIBUTION AUX TRAVAUX

J'ai réalisé l'ensemble des travaux présentés dans les publications n°I et II. Certains antigènes nécessaires aux travaux décrits dans ces deux manuscrits m'ont été fournis par mes collègues du Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules. Estelle Pagliero et Laurent Chesnel m'ont fourni respectivement les antigènes PBP2b et PBP2x nécessaires à la purification des anticorps correspondants. Marjolaine Noirclerc-Savoie a réalisé la production de l'antigène FtsW. Les souches de pneumocoque mutantes nous ont été données par Régine Hakenbeck (Max-Planck Institut, Berlin).

J'ai produit tout le matériel restant nécessaire à ces travaux, mis au point et réalisé toutes les expériences, ainsi que la prise et le traitement des images. Les publications ont été rédigées avec l'aide d'André Zapun et de Thierry Vernet. Ce savoir-faire en immunofluorescence m'a permis de contribuer à la publication de Marjolaine Noirclerc-Savoie *et al.* en étudiant la localisation de FtsW de *S. pneumoniae* chez *E. coli*. Cette publication est présentée en annexe.

N'ayant pas de formation initiale en cristallographie, Andréa Dessen, Lucille Pernot et Otto Dideberg m'en ont enseigné la théorie et m'ont formé aux méthodes de cristallogénèse et de résolution de structure. J'ai réalisé toutes les expériences, la collecte, le traitement de données et l'affinement de la structure de sPBP3\*, excepté le phasage des données de sPBP3\* sélénée qui a été effectué par Lucille Pernot. L'analyse par spectrométrie de masse de sPBP3\* native et sélénée a été confiée au Laboratoire de Spectrométrie de masse de l'institut.



## GLOSSAIRE

<b>7-ACA</b>	7-amino-céphalosporinique
<b>6-APA</b>	6-amino-pénicillanique
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ASPRE</b>	active site serine penicillin recognizing enzyme
<b>CPase</b>	carboxypeptidase
<b>Da</b>	dalton
<i>dcw</i>	division and cell wall
<b>dNTP</b>	désoxyribonucléotide triphosphate
<b>DO</b>	densité optique
<b>DTT</b>	1,4-dithiothréitol
<b>EDTA</b>	acide tétra-acétique éthylène diamine
<b>Fts</b>	filamentous temperature sensitive
<b>GlcNac</b>	N-acétyl-glucosamine
<b>Gram-</b>	Gram négative
<b>Gram+</b>	Gram positive
<b>GST</b>	glutathion S-transférase
<b>GT</b>	glycosyltransférase
<b>IPTG</b>	isopropyl-bêta-D-thio-galactopyranoside
<b>M</b>	molaire
$\mu$	micro
<b>mol</b>	mole
<b>mL</b>	millilitre
<b>MurNac</b>	N-acétyl-muramique
<b>PAGE</b>	polyacrylamide gel electrophoresis
<b>PBP</b>	penicillin-binding protein
<b>PCR</b>	polymérase chain reaction
<b>PEG</b>	Polyéthylène Glycol
<b>rpm</b>	rotations par minute
<b>S2d</b>	acide N-benzoyl-D-alanylmercaptoacétique
<b>SDS</b>	sodium-dodecyl-sulfate
<b>TE</b>	tris-EDTA
<b>TP</b>	transpeptidase
<b>U</b>	unité
<b>UDP</b>	uridine diphosphate



# TABLE DES MATIERES

<b>PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>1</b>
<b>DE LA DECOUVERTE DE LA BACTERIE A LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>1</b>
I. La révolution pasteurienne et l'ère des antibiotiques.....	2
II. L'émergence de la résistance aux antibiotiques.....	3
III. La contre attaque thérapeutique.....	3
<b>LE PEPTIDOGLYCANE : L'EXOSQUELETTE BACTERIEN AUX MULTIPLES FONCTIONS.....</b>	<b>5</b>
I. Le peptidoglycane, une macromolécule hautement conservée.....	5
II. Composition et ultrastructure du peptidoglycane.....	7
III. Fonctions du peptidoglycane.....	10
<b>BIOSYNTHESE ET METABOLISME DU PEPTIDOGLYCANE.....</b>	<b>12</b>
I. Synthèses cytoplasmique et membranaire du précurseur du peptidoglycane.....	12
II. Assemblage périplasmique du peptidoglycane.....	12
III. La famille des Penicillin-Binding Proteins (PBPs).....	14
III.1. Fonctions enzymatiques associées aux PBPs et classification des PBPs.....	14
III.2. Les PBPs chez <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	16
III.2.1. La classe A des PBPs de haute masse moléculaire.....	16
III.2.2. La classe B des PBPs de haute masse moléculaire.....	19
III.2.3. Les PBPs de faible masse moléculaire.....	20
III.2.3.1. Structure tri-dimensionnelle de PBP5 d' <i>E. coli</i> .....	21
III.2.3.2. Fonctions enzymatique et cellulaire des PBPs de faible masse moléculaire.....	23
IV. Modèles de synthèse du peptidoglycane pour les bacilles et les coques.....	25
IV.1. Synthèse du peptidoglycane chez les bacilles.....	25
IV.2. Relations entre la composition du peptidoglycane et la croissance d' <i>E. coli</i> .....	27
IV.3. Synthèse du peptidoglycane chez les coques.....	28
IV.4. Relations entre la composition du peptidoglycane et la croissance de <i>S. pneumoniae</i> .....	31
<b>INHIBITION DE LA SYNTHESE DU PEPTIDOGLYCANE.....</b>	<b>33</b>
I. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane.....	33
I.1. Les $\beta$ -lactamines.....	33
I.2. Inhibition des activités transpeptidase et D,D-carboxypeptidase par les $\beta$ -lactamines.....	34
I.3. Inhibition de la réaction de transglycosylation par les glycopeptides et les moénomycines.....	35
II. La résistance aux $\beta$ -lactamines chez <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	37
II.1. La modification des PBPs à la base de la résistance chez le pneumocoque.....	37
II.2. Structure du peptidoglycane de souches de pneumocoque résistantes aux $\beta$ -lactamines.....	38
<b>CROISSANCE ET DIVISION BACTERIENNE : UNE QUESTION DE COMPLEXES ?.....</b>	<b>39</b>
I. Synthèse du peptidoglycane et complexes multienzymatiques associés.....	40
I.1. Le modèle « Trois pour un ».....	40
I.2. Complexes multienzymatiques de synthèse du peptidoglycane.....	42
II. Acteurs protéiques de la division cellulaire.....	45
II.1. Positionnement du site de division.....	46
II.2. Recrutement des protéines Fts au site de division.....	47
II.2.1. FtsZ.....	48
II.2.2. FtsA et ZipA.....	49
II.2.3. FtsK.....	50
II.2.4. FtsQ/DivIB, FtsL/DivIC et FtsB(YgbQ).....	50
II.2.5. FtsW et FtsI.....	51
II.2.6. FtsN.....	53



<b>PRESENTATION ET OBJECTIFS DES TRAVAUX.....</b>	<b>55</b>
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>59</b>
<b>Techniques relatives à l'expression et la purification de sPBP3* .....</b>	<b>59</b>
I.    Techniques de biologie moléculaire .....	59
II.   Construction du vecteur pGEX-sPBP3* .....	60
III.  Expression et purification de sPBP3* .....	61
<b>Etude fonctionnelle de sPBP3* .....</b>	<b>61</b>
I.    Titration de la quantité de sPBP3* active.....	61
II.   Affinité de sPBP3* pour différents antibiotiques.....	62
III.  Vitesse de désacylation des complexes pénicilloyl-sPBP3*.....	62
IV.   Efficacité d'hydrolyse du pseudo-substrat S2d .....	63
<b>DETERMINATION DE LA STRUCTURE DE PBP3.....</b>	<b>63</b>
I.    Cristallisation de sPBP3* native .....	63
I.1.   Technique de la goutte suspendue .....	63
I.2.   Cryocongélation des cristaux de sPBP3* .....	64
II.   Méthodes de phasage.....	65
II.1.  Le remplacement moléculaire .....	65
II.2.  La méthode du remplacement isomorphe multiple (MIR), trempage des cristaux natifs de sPBP3* en présence de complexes d'atomes lourds .....	65
II.3.  La méthode MAD .....	66
II.3.1.  Principe .....	66
II.3.2.  Production et purification du dérivé sélénié de sPBP3* .....	67
<b>Technique d'immuno-fluorescence .....</b>	<b>68</b>
I.    Fixation des bactéries .....	68
II.   Immuno-marquage des protéines .....	69
<b>PRESENTATION DE LA PUBLICATION N°I.....</b>	<b>71</b>
Growth and division of <i>Streptococcus pneumoniae</i> : localization of the high molecular weight Picillin-Binding Proteins during the cell cycle	
<b>PRESENTATION DE LA PUBLICATION N°II.....</b>	<b>73</b>
The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division of <i>S. pneumoniae</i>	
<b>ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE-FONCTION DE LA D,D-CARBOXYPEPTIDASE PBP3.....</b>	<b>77</b>
<b>CARACTERISATION ENZYMATIQUE DE PBP3 .....</b>	<b>79</b>
I.    Titration de la quantité de sPBP3* active.....	79
II.   Affinité de sPBP3* pour différents antibiotiques.....	79
III.  Vitesse de désacylation des complexes pénicilloyl-sPBP3*.....	79
IV.   Efficacité d'hydrolyse du pseudo-substrat S2d .....	80
<b>ETUDE STRUCTURALE DE PBP3 .....</b>	<b>81</b>
I.    Cristallisation de sPBP3* native .....	81
I.1.  Conditions de cristallogénèse.....	81
I.2.  Conditions de cryocongélation des cristaux de sPBP3* .....	83
I.3.  Caractérisation des cristaux natifs de sPBP3*.....	84
II.   Premières tentatives de détermination de la structure de sPBP3* .....	86
II.1.  Le remplacement moléculaire .....	86

II.2.	La méthode du remplacement isomorphe multiple (MIR).....	86
III.	Détermination de la structure de sPBP3* par la méthode MAD .....	88
III.1.	Contrôle de la substitution des méthionines par spectrométrie de masse.....	88
III.2.	Cristallisation de l'enzyme séléniée.....	88
III.3.	Enregistrement et traitement du jeu de données MAD .....	89
III.4.	Détermination de la position des diffuseurs anomaux et calcul des phases.....	91
III.5.	Première construction automatique d'un modèle de sPBP3* à 2.8 Å .....	93
IV.	Construction et affinement du modèle de sPBP3* sélénié.....	93
IV.1.	Construction du modèle de sPBP3* dans la carte MAD.....	93
IV.2.	Affinement du modèle de sPBP3* sélénié.....	93
IV.3.	Résultats .....	94
IV.4.	Validité du modèle.....	95
V.	Description de la structure de PBP3 .....	95
V.1.	Structure générale .....	96
V.2.	Symétrie non cristallographique .....	98
V.3.	Facteurs de température.....	98
V.4.	Description du site actif.....	99
V.5.	Homologie structurale entre sPBP3*, sPBP5', K15, TEM-1, PBP2x et PBP2a.....	100
V.5.1.	Comparaison des structures de sPBP3* et sPBP5' .....	100
V.5.1.1.	Domaine I N-terminal.....	100
V.5.1.2.	Comparaison du site actif.....	101
V.5.1.3.	Domaine II C-terminal.....	102
V.5.2.	Comparaison des structures de PBP3 et K15 .....	104
V.5.3.	Comparaison des structures de PBP3 et TEM-1 .....	105
V.5.4.	Comparaison des structures de PBP3 et PBP2x ou PBP2a.....	107
V.6.	Comparaison de différentes « D,D-carboxypeptidases de type PBP5 ».....	108
V.6.1.	Définition des « D,D-carboxypeptidases de type PBP5 ».....	108
V.6.2.	Identification de deux groupes de D,D-carboxypeptidases de type PBP5 .....	108
VI.	Discussion .....	110
VI.1.	Fonction catalytique du domaine I.....	110
VI.1.1.	Acylation de PBP3 par les β-lactamines et les substrats peptidiques.....	111
VI.1.1.1.	Acylation par les β-lactamines .....	111
VI.1.1.2.	Acylation par le substrat peptidique.....	112
VI.1.2.	Hydrolyse du complexe acyl-enzyme .....	113
VI.1.2.1.	Hydrolyse du complexe formé par PBP3 et la β-lactamine .....	113
VI.1.2.2.	Hydrolyse du complexe formé par PBP3 et le substrat peptidique.....	114
VI.2.	Le domaine II.....	114
VI.3.	Rôle de la boucle « Ω-like ».....	115
VI.4.	Evolution des D,D-carboxypeptidases de type PBP5, des β-lactamases de classe A et de la D,D-transpeptidase K15 .....	116
VI.5.	Fonction biologique de PBP3.....	116
VI.5.1.	Quel est ou quels sont le ou les substrat(s) de PBP3 ? .....	116
VI.5.1.1.	Le lipide II, les précurseurs polysaccharidiques du peptidoglycane et le peptidoglycane pré-existant.....	116
VI.5.1.2.	Pentapeptides monomériques ou acétylés.....	117
VI.5.2.	Accessibilité de PBP3 à ses substrats pentapeptidiques.....	119

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... 123**

## **BIBLIOGRAPHIE..... 129**

## **ANNEXES..... 145**



## **PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE**



## ***DE LA DECOUVERTE DE LA BACTERIE A LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES***

En 1610, Galilée vient d'être projeté sur le devant de la scène avec la publication du *Sidereus nuncius* (« le Messager céleste »). Il y rapporte entre autres l'observation de quatre satellites tournant autour de Jupiter (Io, Europe, Ganymède et Callisto), donnant la preuve que la Terre n'est pas le centre de l'univers. Dans la même année, Galilée détourne sa lunette des astres pour la braquer vers un objet imperceptible. Constatant alors sa taille monumentale, il s'aperçoit que le même instrument permet de sonder les deux infinis, pulvérisant les frontières du monde. Le microscope est né mais il est dédaigné par les savants qui le considèrent « indigne du sage naturaliste et incapable de rivaliser avec les spéculations de l'esprit » (Darmon, 1999). Il passionne en revanche les philosophes, les « curieux » et les amateurs éclairés des XVII<sup>e</sup> et XVIII<sup>e</sup> siècles. Il est en particulier l'instrument de prédilection du micrographe hollandais Antony Van Leeuwenhoek (1632-1723) qui va rassembler à lui seul plus de découvertes que n'en feront l'ensemble des microbiologistes en un siècle et demi. En 1674, ce « premier bactériologiste » observe dans une goutte de pluie un peuple microscopique à ce jour inconnu, le peuple des animalcules : « leur taille est infime, leur mouvement perpétuel, leur nombre prodigieux » (Darmon, 1999). Commence alors l'histoire de la microbiologie qui demeurera jusqu'à la moitié du XIX<sup>e</sup> siècle à l'état de préhistoire tant ces « atomes vivants » seront, comme la microscopie, méprisés par les savants. Il est cependant fort probable que la masse d'observations merveilleuses collectées sous les microscopes des XVII<sup>e</sup> et XVIII<sup>e</sup> siècles aura influencé le génie créateur de Pasteur et de ses contemporains microbiologistes.

Pendant près de trois siècles, la théorie de l'étiologie animalculiste des maladies infectieuses va rester dans l'ombre. La théorie de la génération spontanée est au contraire généralement admise. Elle soutient l'existence d'une génération indépendante de toute forme de procréation, de tout germe préexistant, et produite par la seule impulsion d'une force mystérieuse appelée « force plastique » ou « végétative ». A peine se heurte-t-elle à la théorie de la panspermie qui veut que l'univers soit semé de germes préexistants qui flottent dans l'air et se développent à la faveur de certaines circonstances.

## I. La révolution pasteurienne et l'ère des antibiotiques

En 1855, Louis Pasteur découvre les ferments organiques et devient l'instigateur d'une des plus grandes révolutions de la biologie, la révolution pasteurienne (1855-1881) qui signera la fin des théories spontanéistes. Durant ce quart de siècle faste à la microbiologie, le pouvoir infectieux d'un grand nombre de germes va être mis en évidence, les vertus de l'antisepsie vont être découvertes et surtout, Pasteur et Joubert vont pressentir l'importance d'un phénomène alors appelé « concurrence vitale des micro-organismes » ou « antibiose ». De nombreux antagonismes microbiens seront dès lors observés et mèneront à la découverte des antibiotiques au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle.

Entre 1880 et 1920, la bactériologie prend véritablement son essor avec la découverte de nombreux vaccins, dont notamment le vaccin antirabique (Pasteur, Roux et Chamberland, 1884), le vaccin contre la peste (Yersin, Calmette et Borel, 1895) et contre la tuberculose (BCG ou Bacille cilié Calmette-Guérin, 1912). C'est à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle que le phénomène d'antagonisme microbien est véritablement étudié par Ernest Duchesne (1874-1913) qui démontre les vertus prophylactiques d'une moisissure appelée *Penicillium glaucum* qui se développe sur le bleu d'Auvergne (1897). Bien qu'il ne tire aucune application pratique de ses observations, il est le précurseur de la seconde révolution biologique, l'ère des antibiotiques. En 1928 Alexander Fleming (1881-1955) redécouvre le pouvoir bactéricide du *P. glaucum* et parvient à isoler la pénicilline à partir d'une moisissure encore plus efficace, le *Penicillium notatum*, mais il abandonne ses recherches en raison de l'instabilité du produit. En 1935 Gerhard Dogmak met au point le premier des sulfamides qui semblent devoir supplanter la pénicilline mais le spectre microbien de ces antibiotiques, qui ne détruisent pas les staphylocoques, reste limité. De plus, les cas de « sulfamido-résistance » se multiplient et le remède se révèle d'une toxicité importante. En 1938 René Dubos (1901-1982) parvient à extraire du *Bacillus brevis* la tyrothricine, mélange de gramicidine et de tyrocidine, qui sera utilisée dès le début de la seconde guerre mondiale. C'est cette même guerre qui incitera une équipe de chercheurs de l'université d'Oxford, sous la direction d'Howard Florey (1898-1968) et Ernst Boris Chain (1906-1979), à exploiter les propriétés antibactériennes du *P. notatum*. En 1940 ils en isolent la pénicilline qu'ils feront entrer dans la thérapeutique, ce qui leur vaudra l'attribution du prix Nobel de médecine en 1945. La pénicilline est testée sur l'homme en 1941, la découverte par un laboratoire américain du *Penicillium chrysogenum* permettra de la produire en grande quantité. Elle est administrée

pour la première fois de façon massive au cours du débarquement allié en Sicile en 1943, et en 1946, elle est en vente libre dans les pharmacies.

## II. L'émergence de la résistance aux antibiotiques

La découverte puis l'usage thérapeutique à grande échelle des antibiotiques, dont les pénicillines, a bouleversé la seconde moitié du XX<sup>e</sup> siècle en faisant considérablement chuter la mortalité due aux infections bactériennes. Mais à la fin des années 50, alors que certains clament déjà la fin du règne des maladies infectieuses, les premières souches de staphylocoques résistants à la pénicilline G donnent les premiers signes d'alarme. La communauté pharmaco-médicale réagit alors en modifiant de manière semi-synthétique les antibiotiques préexistants afin de les rendre plus efficaces, d'élargir leur spectre antibactérien et de biaiser les facteurs de résistance. L'administration de ces nouveaux composés se solde systématiquement par l'apparition toujours plus rapide de souches bactériennes résistantes. Aujourd'hui en France, 50% des isolats cliniques de pneumocoques sont résistants à la pénicilline G et certains à toutes les  $\beta$ -lactamines. De manière plus générale, plusieurs souches bactériennes sont résistantes aux 6 principales familles d'antibiotiques à action bactéricide ( $\beta$ -lactamines, aminoglycosides, quinolones, imidazoles, polymyxines et glycopeptides), composés de dernière génération inclus. La grande plasticité du génome des bactéries leur confère une capacité naturelle à évoluer, qui est à la base de la diversité actuelle du monde vivant. Cette plasticité favorise l'apparition de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques. La dissémination de la résistance est par ailleurs accélérée par la capacité de certaines bactéries, comme *Streptococcus pneumoniae*, à échanger avec d'autres espèces bactériennes du matériel génétique pouvant coder pour des marqueurs de résistance. Enfin, la sélection de souches résistantes a été favorisée par la surprescription des antibiotiques en thérapie humaine et leur usage vétérinaire extensif avec notamment une utilisation comme facteurs de croissance en complément de l'alimentation animale.

## III. La contre attaque thérapeutique

L'adage « si ça ne peut pas faire de bien, ça ne fait de pas de mal » longtemps appliqué aux antibiotiques est aujourd'hui dénoncé et une nouvelle politique thérapeutique est mise en



place. Les populations sont maintenant informées quant au risque inhérent à un usage abusif des antibiotiques, ce qui aide le corps médical à effectuer des prescriptions mieux ciblées. L'usage de ces molécules dans l'élevage agricole a par ailleurs été limité, et un réseau de surveillance épidémiologique de la résistance aux antibiotiques s'est organisé, le tout devant permettre de ralentir la dissémination de la résistance.

Malgré ces mesures, il est urgent de renforcer notre arsenal antibiotique. Une première stratégie consiste à élucider les mécanismes de résistance dans le but de modifier chimiquement les antibiotiques actuels pour rétablir leur efficacité. Les contraintes inhérentes à cette stratégie ne sont pas des moindres et limitent considérablement ses chances de réussite car il s'agit de contourner les mécanismes de résistance développés par les bactéries, de développer une molécule non toxique pour l'homme et assurer sa synthèse efficace.

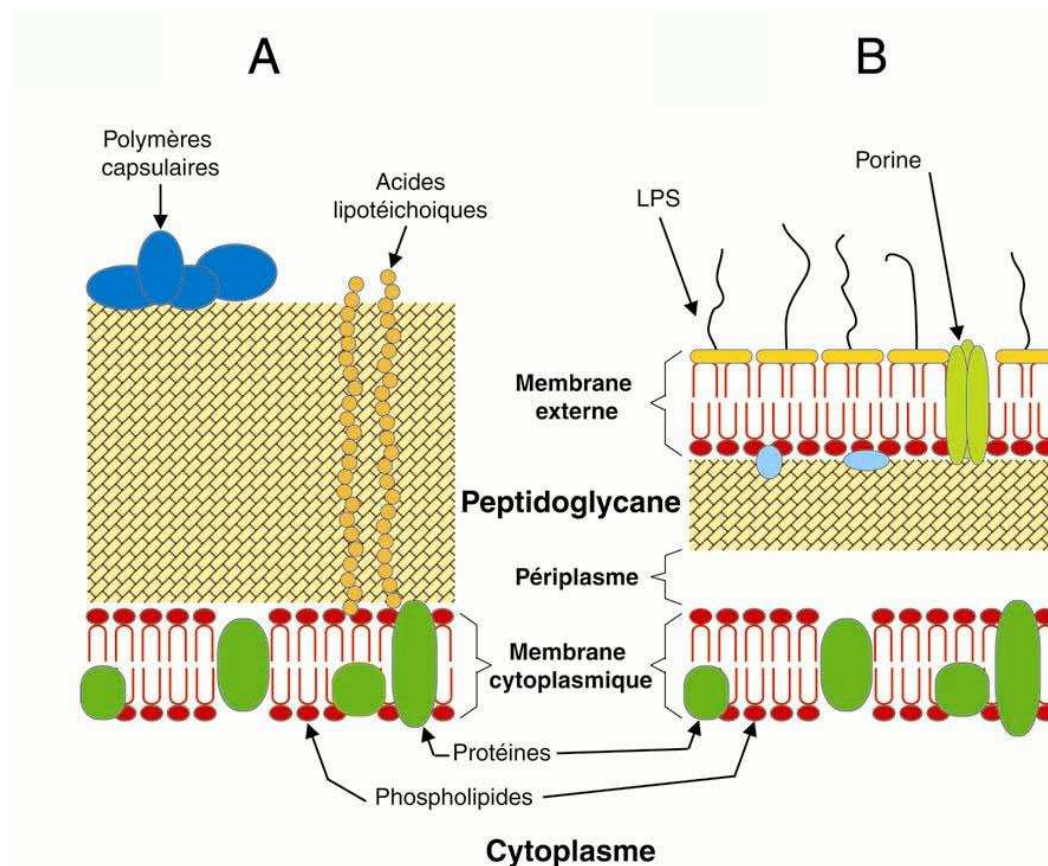
L'alternative, elle aussi très complexe, consiste à identifier de nouvelles cibles au sein de voies métaboliques vitales à la bactérie. Par exemple, les processus de croissance et de division cellulaire, dont les acteurs sont généralement des protéines essentielles à la survie de la bactérie, constituent une source précieuse de cibles thérapeutiques potentielles. L'élucidation de ces deux processus vitaux requiert la compréhension des mécanismes de synthèse de la paroi bactérienne qui font intervenir notamment la famille des « Penicillin-Binding Proteins » (PBPs). Ces enzymes sont déjà inhibées par les antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines mais ont développé des résistances à ces antibiotiques. L'étude de la famille des PBPs permet donc de générer des connaissances utiles à la fois pour contrer le phénomène de résistance et pour parvenir à mieux comprendre les mécanismes de croissance et de division bactérienne. Il s'agit d'une recherche scientifique fondamentale incontournable pour diversifier nos stratégies thérapeutiques et pour enrichir notre connaissance d'acteurs, anciens et contemporains, du vivant sur la terre : les bactéries.

Dans la suite de cette présentation bibliographique, seront décrites les connaissances actuelles concernant la croissance et la division bactérienne. L'étude des PBPs ayant constitué l'objet de cette thèse, l'exposé sera centré autour de cette famille de protéines et de leur produit de synthèse, le peptidoglycane. Nous présenterons les diverses fonctions et la voie de biosynthèse de ce polymère en approfondissant particulièrement la description de la famille des PBPs. Nous expliquerons comment la synthèse du peptidoglycane est inhibée par les  $\beta$ -lactamines. Enfin, nous présenterons les différentes hypothèses concernant l'existence de complexes mutienzymatiques en charge de la croissance et de la division bactérienne ainsi que les acteurs non-PBPs impliqués dans la division.

# LE PEPTIDOGLYCANE : L'EXOSQUELETTE BACTERIEN AUX MULTIPLES FONCTIONS

## I. Le peptidoglycane, une macromolécule hautement conservée

L'enveloppe cellulaire des eubactéries présente des différences d'organisation majeures (Figure 1 et Tableau I) pouvant être mises en évidence par la méthode de coloration différentielle de Gram. Cette méthode mise au point en 1884 par Gram (1853-1938) permet de distinguer les bactéries Gram-négatives (Gram-), qui ont une paroi fine et très riche en lipides, des bactéries Gram-positives (Gram+) qui ont une paroi épaisse et dense.



**Figure 1. Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire des bactéries Gram-positives (A) et Gram-négatives (B).** Les deux types de paroi possèdent une membrane cytoplasmique (interne) composée d'une double couche de phospholipides (en rouge) et de protéines (en vert foncé). A : Chez les bactéries Gram-positives, des acides lipotéichoïques traversent l'épaisse couche de PG qui est le composant majoritaire de la paroi, des polymères capsulaires peuvent être présents à sa surface. B : Les bactéries Gram-négatives possèdent une couche plus fine de PG ainsi qu'une membrane externe composée de phospholipides, de lipopolysaccharides (LPS), de lipoprotéines (en bleu clair) et de porines (en vert clair) régulant le passage de molécules à travers cette membrane. L'espace entre la membrane cytoplasmique et le peptidoglycane correspond à l'espace périplasmique.

**Tableau I. Comparaison des deux types d'enveloppe cellulaire bactérienne**

Propriétés	Gram positive	Gram négative
Épaisseur de l'enveloppe cellulaire	20-80 nm	10 nm
Nombre de membranes	1	2
Proportion de peptidoglycane	>50%	10-20%
Acides téichoïques	+	-
Lipides et lipoprotéines	0-3%	58%
Proportion de protéines	0%	9%
Lypopolysaccharides	0%	13%
Sensibilité à la pénicilline	+	- (plus faible)
Digestion par le lysozyme	+	- (plus lente)

Les deux types bactériens possèdent une membrane cytoplasmique et leur paroi contient une entité commune et essentielle, le peptidoglycane (PG) ou muréine, polymère amino-polysaccharidique dont la structure sera détaillée dans les paragraphes suivants. L'épaisseur du PG est plus faible chez les bactéries Gram-, elle mesurerait entre 3 et 6 nm suivant des études récentes menées sur du PG sec ou réhydraté d'*Escherichia coli* (Yao *et al.*, 1999). Le doute persiste toujours quant au nombre de couches de polymère que cette épaisseur représenterait, il a été proposé notamment que le PG d'*E. coli* pourrait être composé d'une à trois couches (Labischinski *et al.*, 1991) ou encore d'une couche unique additionnée des produits de recyclage présents à sa surface externe (Goodell, 1985; Yao *et al.*, 1999). La paroi des bactéries Gram- est par ailleurs surmontée par une membrane lipidique externe qui délimite avec la membrane cytoplasmique (membrane interne) l'espace périplasmique, compartiment supplémentaire propre aux Gram-. L'épaisseur du PG des bactéries Gram+ est beaucoup plus importante puisqu'elle est comprise entre 15 et 30 nm, ce qui correspondrait à un nombre de couches de polymère compris entre 20 et 25 (Beveridge, 1981). De nombreuses autres particularités différencient les deux groupes de bactéries, telles que la présence d'acides lipoteichoïques traversant la couche de PG des Gram+ ou la présence de lipopolysaccharides (LPS) ancrés dans la membrane externe des Gram-.

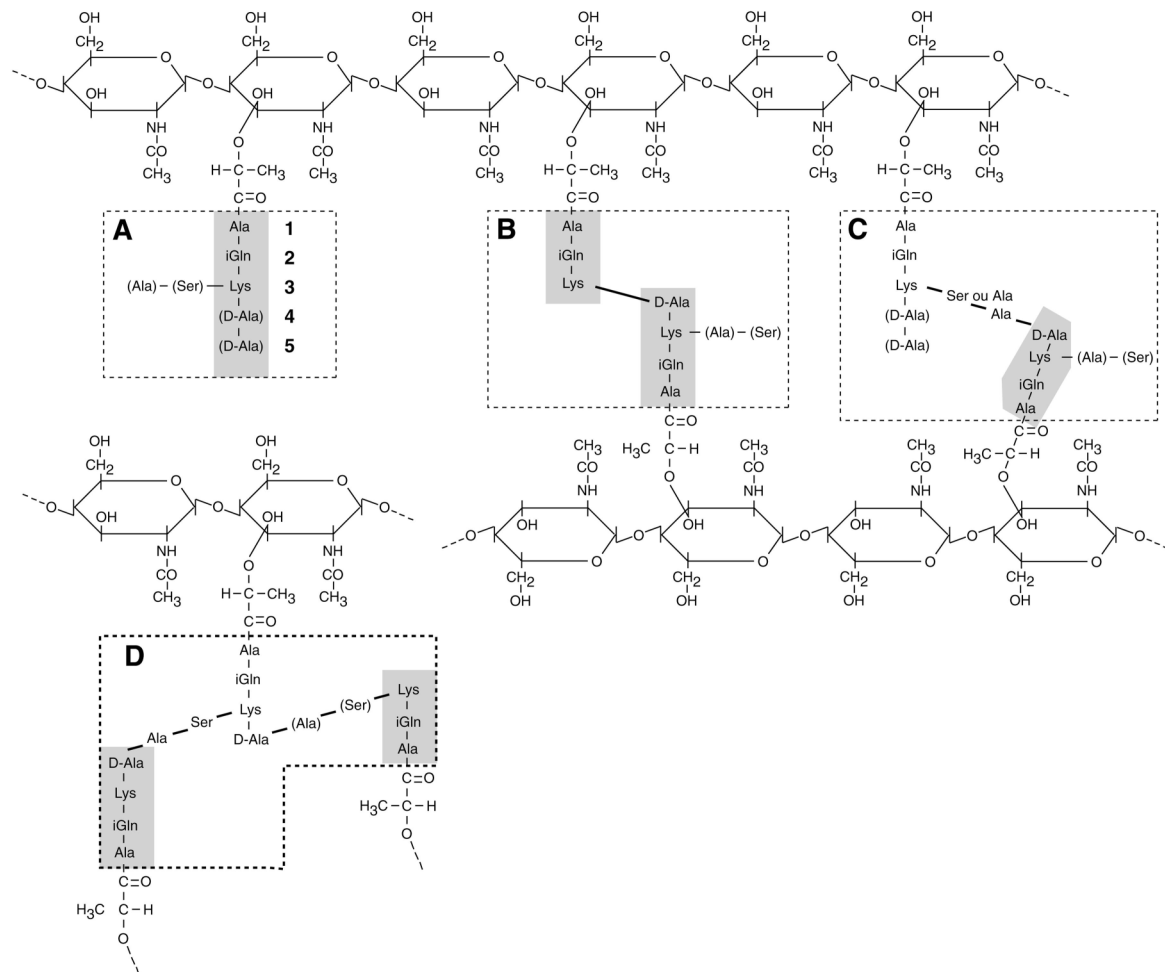
Certaines espèces bactériennes échappent à la classification de Gram. Les mycobactéries par exemple, possèdent une organisation pariétale atypique. Une couche de PG dense les classe dans le groupe des Gram+ mais la présence d'une épaisse couche lipidique recouvrant le PG leur confère certaines propriétés propres aux Gram- telles qu'une grande résistance au stress environnemental ou une faible perméabilité aux antibiotiques. Les mycoplasmes, pathogènes intracellulaires obligatoires, sont quant à eux totalement dépourvus de PG, ce qui explique pourquoi ils sont incapables de survivre à l'extérieur de leur hôte. Une étude phylogénétique réalisée sur des bactéries du genre *Mycoplasma* suggère que cette famille pourrait descendre d'un ancêtre Gram+ qui aurait perdu la capacité de synthétiser le

PG (Walker, 1983). Les Chlamydiées sont également dépourvues de PG (Barbour *et al.*, 1982). Le séquençage du génome de *Chlamydiae trachomatis* (Stephens *et al.*, 1998) a montré que les bactéries possèdent toute l'information nécessaire à la voie de synthèse du polymère excepté la fonction glycosyltransférase nécessaire à la polymérisation des chaînes de sucre, d'où l'hypothèse selon laquelle, chez les Chlamydiées, un polymère pariétal dépourvu de chaînes glycanes remplacerait le PG classique (Ghuysen et Goffin, 1999). Outre ces quelques exemples, la quasi-totalité des bactéries ont développé une enveloppe cellulaire dont le composant majeur est le PG. La conservation de cette macromolécule au cours de l'évolution bactérienne donne la preuve du fort avantage sélectif que procure le PG aux bactéries qui en sont pourvues.

## II. Composition et ultrastructure du peptidoglycane

Bien que la composition chimique du PG varie d'une espèce bactérienne à l'autre, avec plus d'une centaine de compositions différentes recensées, l'architecture de base de cette macromolécule hétéro-polymérique reste fortement conservée. Le PG est composé de chaînes polysaccharidiques courtes, comprenant pour la grande majorité de 5 à 10 unités disaccharidiques chez les Gram- (Harz *et al.*, 1990), reliées covalamment les unes aux autres par des chaînons peptidiques.

Le réseau de PG résulte de la polymérisation et de l'intégration au PG préexistant d'un précurseur disaccharide-pentapeptide par des réactions de transglycosylation et de transpeptidation. Le disaccharide est constitué de *N*-acétylglucosamine (GlcNac) et d'acide *N*-acétylmuramique (MurNac) liés par des liaisons de type  $\beta$ -1,4, seul le MurNac est substitué par les chaînes peptidiques (Figure 2). La composition du disaccharide varie très peu entre les différents types de PG alors que celle de la partie peptidique est beaucoup plus variable. Le pontage peptidique consiste à relier la fonction carboxyle du quatrième acide aminé (très généralement une D-alanine) d'une chaîne peptidique à une fonction amine d'une chaîne voisine. Il est possible d'observer une insertion d'acides aminés entre les résidus portant les groupes carboxyle et amine. Ces peptides liés de manière indirecte, appelés également « peptides branchés », constituent une structure très fréquente chez les bactéries résistantes aux antibiotiques.

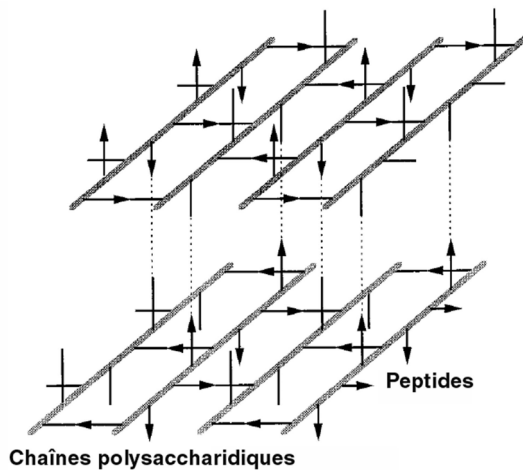


**Figure 2. Structure chimique du peptidoglycane de *S. pneumoniae*.** Une alternance de *N*-acétylglucosamine et d'acide *N*-acétylmuramique liés en bêta-1,4 constitue les chaînes de polysaccharides. Sur les chaînes latérales peptidiques, la nature du résidu en position 3 varie en fonction des organismes. Le PG d'une souche sauvage de *S. pneumoniae* sensible aux  $\beta$ -lactamines contient environ 40% de monomères (A), 50% de dimères (B et C) et 10% de trimères (D). Les chaînes peptidiques peuvent être linéaires (chaîne grisée) et établir des liaisons directes (B) avec une chaîne peptidique voisine. Les peptides sont dits « branchés » lorsque la lysine en position 3 est substituée par des dipeptides Ser-Ala ou Ala-Ala, les interconnexions peptidiques qui en résultent sont alors indirectes (C). Les résidus présents de manière facultative sont indiqués entre parenthèses.

Chez *S. pneumoniae*, la chaîne pentapeptidique est constituée d'une alternance de L- et D-aminoacides commençant avec une L-alanine, suivie d'une D-isoglutamine puis d'une L-lysine précédant les deux D-alanines C-terminales (Figure 2). La présence des deux D-alanines C-terminales est très rare chez le pneumocoque dont le PG est composé majoritairement de monomères tripeptidiques et de dimères tri-térapeptidiques (Garcia-Bustos *et al.*, 1987). Les chaînes peptidiques peuvent être pontées de manière directe ou indirecte (Figure 2). Les liaisons indirectes sont composées de dipeptides serine-alanine ou alanine-alanine (Garcia-Bustos *et al.*, 1987). La structure peptidique du PG de *S. pneumoniae* est dépendante de la présence de la D,D-coxypeptidase PBP3 (Severin *et al.*, 1992) et peut

être fortement modifiée chez les bactéries résistantes aux  $\beta$ -lactamines (Severin et Tomasz, 1996).

L'orientation des chaînes glycanes constitue un sujet controversé. Pour certains, elles seraient orientées parallèlement à la membrane cytoplasmique (Cooper, 1991; Holtje, 1998), d'autres proposent une orientation irrégulière des chaînes de sucre (Koch, 1988; Koch, 1998) et une dernière théorie suggère qu'elles soient orientées perpendiculairement (Dmitriev *et al.*, 1999; Dmitriev *et al.*, 2000; Dmitriev *et al.*, 2003).



**Figure 3. Architecture d'une multicouche de peptidoglycane.** Les chaînes glycanes sont représentées par les barres grises, les chaînes peptidiques sont symbolisées par les flèches noires et pointent successivement dans les quatre directions de l'espace. Deux brins de PG forment un plan dans lequel des peptides de même direction et de sens opposés peuvent être interconnectés (D'après Höltje, 1998).

Les chaînes de sucres présentent un arrangement hélicoïdal imposé par la substitution du MurNAc en position 3. Cette structure en hélice implique que l'orientation des chaînes peptidiques portées par la chaîne de sucre soit incrémentée de  $90^\circ$  à chaque unité disaccharidique. Les muopeptides pointeraient donc successivement dans les quatre directions de l'espace (Figure 3) (Koch, 2000; Labischinski *et al.*, 1985). Ceci implique que pour un PG monocouche, un pontage entre deux chaînes peptidiques voisines pourrait être formé toutes les 4 unités disaccharidiques (Labischinski *et al.*, 1991), alors que dans le cas de couches multiples, un plus haut degré de réticulation devient possible. Ceci explique fort probablement le bas degré de réticulation des Gram- (25 à 50%) (Glauner *et al.*, 1988) par rapport à celui des Gram+ (70 à 90%) (Labischinski et Maidhof, 1994).

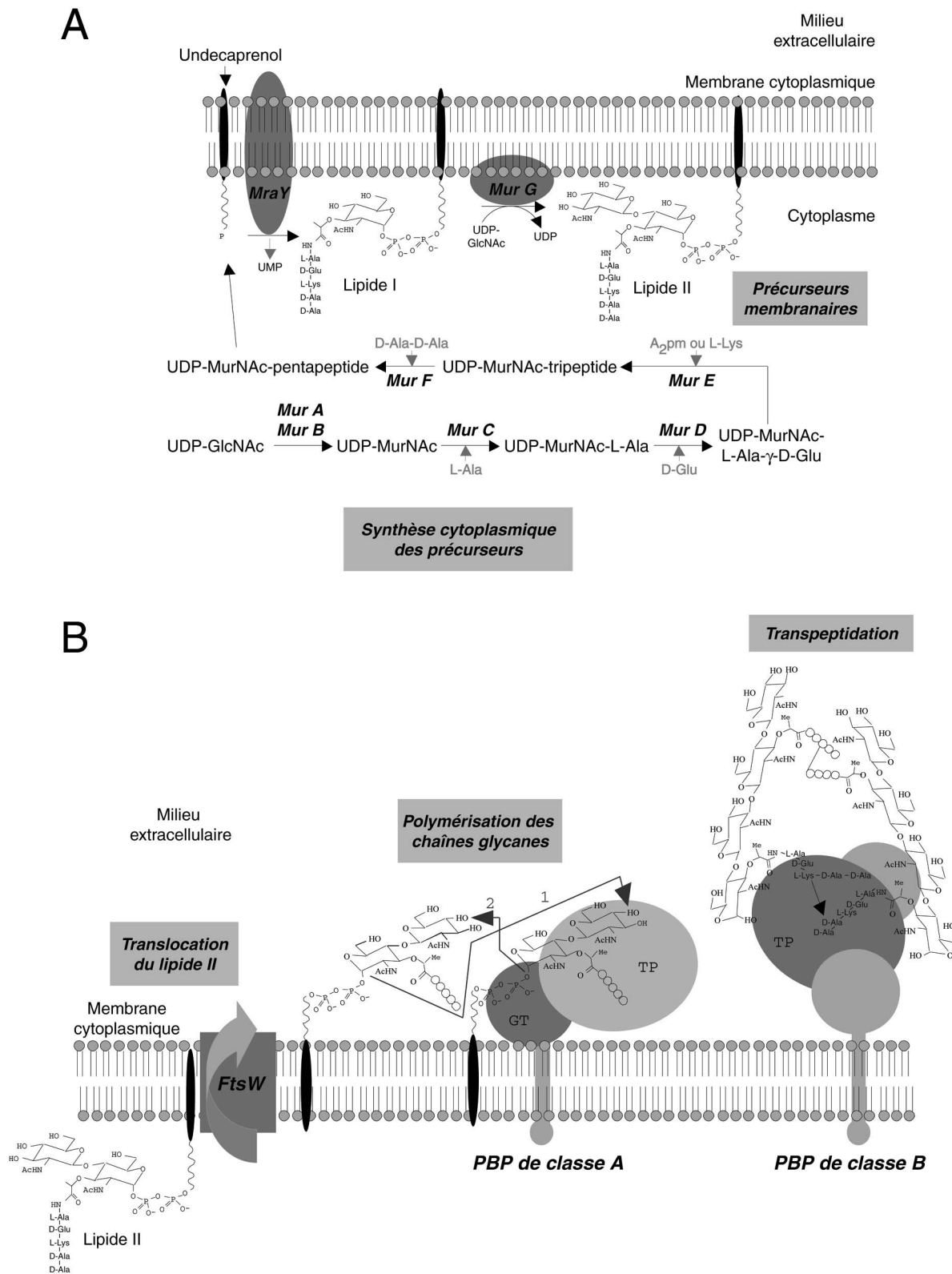
Les chaînes de sucres constituent une structure relativement rigide alors que la liberté conformationnelle des pontages peptidiques confère une grande flexibilité aux chaînes peptidiques. Le PG étant 2 à 3 fois plus élastique longitudinalement que perpendiculairement (Yao *et al.*, 1999), il semble donc très probable que les chaînes de sucres soient orientées parallèlement à la membrane cytoplasmique (Koch, 1998; Verwer *et al.*, 1980; Verwer *et al.*, 1978).

### III. Fonctions du peptidoglycane

Le PG constitue une barrière mécanique assez rigide pour résister à la forte pression osmotique interne, qui peut atteindre 25 atmosphères pour les bactéries Gram+, et suffisamment flexible pour permettre les variations morphologiques causées par la croissance et la division de la bactérie. La solidité de cette macromolécule réticulée dépend de l'intégrité des interconnexions.

L'enveloppe cellulaire doit également garantir l'échange de molécules, qu'il soit passif ou actif, entre les milieux extracellulaire et intracellulaire, tout en prévenant l'entrée de molécules potentiellement toxiques dans la cellule. Outre le rôle admis des membranes comme barrières perméables, le PG des Gram+ aurait également une fonction de perméabilité (Merchant *et al.*, 1995; Scherrer et Gerhardt, 1971). Cette perspective a été peu explorée chez les Gram- où les caractéristiques de perméabilité de la membrane externe éclipsent celles, beaucoup plus spéculatives, du PG. Si le passage de molécules de petite taille se fait certainement par diffusion à travers les mailles du réseau de PG, le passage de molécules plus volumineuses est plus limité. Pour *E. coli* et *Bacillus subtilis*, la taille des pores du PG varierait entre 2 nm et 5 nm, ce qui permettrait le passage de molécules de 25 kDa lorsque la muréine est dans un état relâché, et de molécules de moins de 50 kDa dans un état étiré (Demchick et Koch, 1996; Dijkstra et Keck, 1996). La présence de pores de taille adaptée au passage de gros complexes macromoléculaires (flagelles, pili, systèmes de sécrétion, ...) n'a jamais été démontrée. L'hypothèse la plus probable est celle d'un réarrangement localisé du polymère ou d'une concentration localisée d'enzymes de dégradation du PG.

Dans son rôle d'exosquelette, le PG servirait également de support à la membrane externe des Gram- par l'intermédiaire de lipoprotéines ancrées dans cette membrane et liées de façon covalente à la muréine. Chez les Gram+, le PG jouerait le rôle d'une base d'ancrage pour des protéines de surface.



**Figure 4. Biosynthèse du peptidoglycane.** A : Les étapes cytoplasmiques et les étapes situées près de la membrane interne sont catalysées par les enzymes de la famille Mur. B : Translocation du lipide II et étapes périplasmiques. La fonction de « flippase » ou de translocase de FtsW est hypothétique. L'élargissement des chaînes glycanes par les glycosyltransférases (GT) peut se faire par transfert d'une chaîne naissante attachée à l'undécaprénil sur l'extrémité réductrice (1) ou non-réductrice (2) d'une chaîne naissante. Les transpeptidases (TP) assurent ensuite la réticulation du néo-PG (D'après DiGuilmi *et al.*, 2002).



## ***BIOSYNTHESE ET METABOLISME DU PEPTIDOGLYCANE***

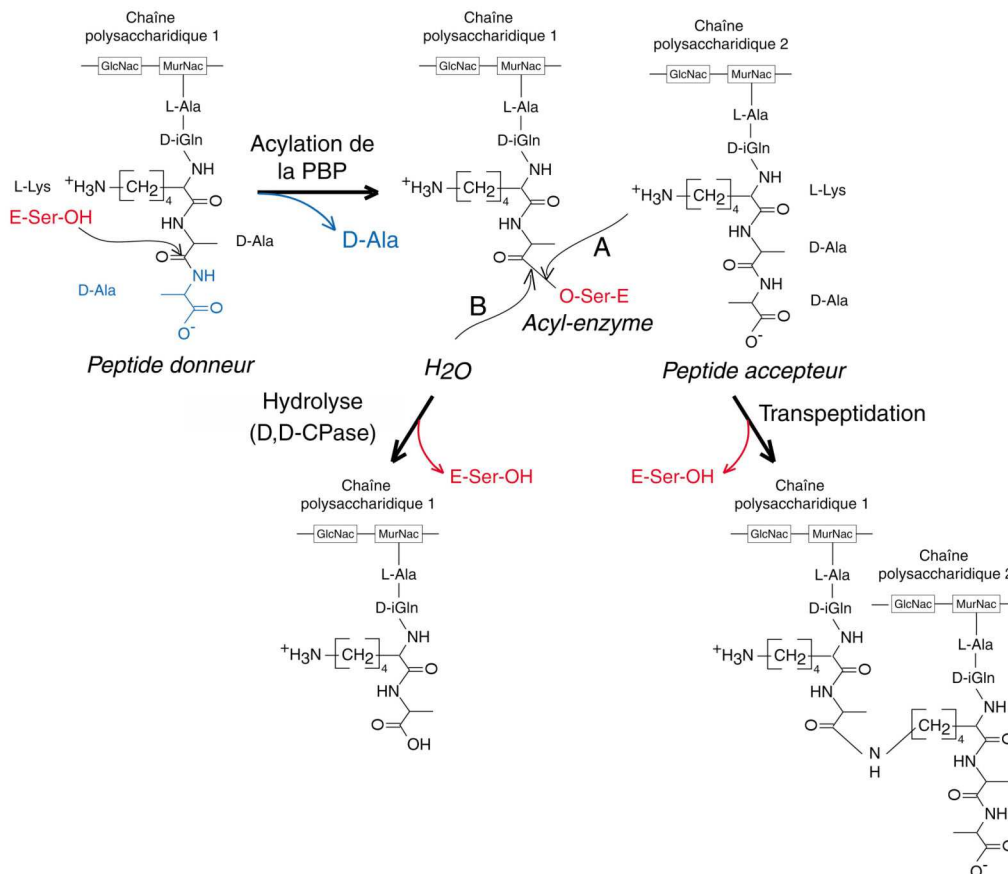
### **I. Synthèses cytoplasmique et membranaire du précurseur du peptidoglycane**

L'assemblage des précurseurs du PG débute dans le cytoplasme par une cascade de réactions enzymatiques qui a été intégralement décrite chez *E. coli* (van Heijenoort, 2001). Des réactions séquentielles catalysées par les protéines de la famille Mur mènent à la formation de l'UDP-monosaccharide-pentapeptide (UDP-MurNAc-pentapeptide) par addition successive des résidus qui composent la chaîne peptidique sur l'Uridine Di-Phosphate-acide *N*-Acétyl Muramique (UDP-MurNAc) (Figure 4A). La première des étapes membranaires est catalysée par la translocase *MraY* qui transfère le motif phospho-MurNAc-pentapeptide de l'UDP-MurNAc-pentapeptide sur l'undécaprényl phosphate (C55). Au produit de la réaction, le MurNAc-pentapeptide-pyrophosphoryl-undécaprénol ou lipide I, la transférase *MurG* ajoute ensuite le GlcNac (Figure 4A). Le produit final membranaire, le GlcNac-MurNAc-pentapeptide-pyrophosphoryl-undécaprénol ou lipide II constitue le précurseur de la muréine. La translocation du lipide II à travers la membrane cytoplasmique est nécessaire à la prise en charge des parties disaccharidiques et peptidiques par les enzymes de synthèse périplasmique de la paroi (Figure 4B). Ce mécanisme de translocation reste non élucidé mais impliquerait probablement une ou plusieurs enzymes nommées « flippases » qui n'ont toutefois pas encore été identifiées.

### **II. Assemblage périplasmique du peptidoglycane**

L'incorporation de l'unité disaccharide pentapeptide au PG pré-existant a lieu dans le périplasme et nécessite deux activités enzymatiques, la transglycosylation et la transpeptidation. Au cours de la transglycosylation, le disaccharide-pentapeptide est intégré à la chaîne glucidique de la paroi pré-existante via la formation d'une liaison de type  $\beta$ -1,4 entre deux résidus successifs de MurNAc et de GlcNac (Figure 4B). Le phénomène de transglycosylation pourrait résulter soit de la jonction d'une chaîne croissante, encore liée à l'undécaprényl phosphate, à l'extrémité réductrice du MurNAc porté par le lipide II (Figure

4B1), soit du transfert de l'extrémité réductrice du MurNAc porté par le lipide II sur l'extrémité non-réductrice d'une chaîne polysaccharidique en cours d'extension (Figure 4B2) (van Heijenoort, 2001). La présence d'un acide 1,6-anhydro muramique en position terminale détectée sur les chaînes polysaccharidiques isolées du PG pourrait être liée à l'arrêt de l'extension ou la dégradation des chaînes qui le portent (Harz *et al.*, 1990).



**Figure 5. Mécanismes réactionnels de la transpeptidation et de la D,D-carboxypeptidation.** L'hydroxyle de la sérine active de l'enzyme (représentée par E) exerce une attaque nucléophile sur le groupe carbonyle de l'avant-dernier D-Ala du peptide donneur. La réaction aboutit à la formation de l'acyl-enzyme avec départ concomitant de l'alanine C-terminale (en bleu). A : Dans le cas de la transpeptidation, l'acyl-enzyme subit une aminolyse par l'amine primaire portée par la lysine d'un peptide accepteur. B : Dans le cas de la D,D-carboxypeptidation, l'acyl-enzyme est hydrolysé.

La transpeptidation permet de réticuler le PG en établissant une liaison covalente entre deux chaînes peptidiques voisines (Figures 4B et 5). Au cours de la réaction, la sérine active du domaine transpeptidase (TP) des PBP exerce une attaque nucléophile sur la liaison D-Ala-D-Ala d'une chaîne pentapeptidique. La rupture de la liaison libère l'énergie nécessaire à la création d'une liaison covalente entre l'enzyme et l'avant-dernier D-Ala du substrat donneur, formant un complexe acyl-enzyme stable. Le complexe subit ensuite une aminolyse par l'amine primaire portée par une chaîne peptidique voisine, le substrat accepteur, menant à la

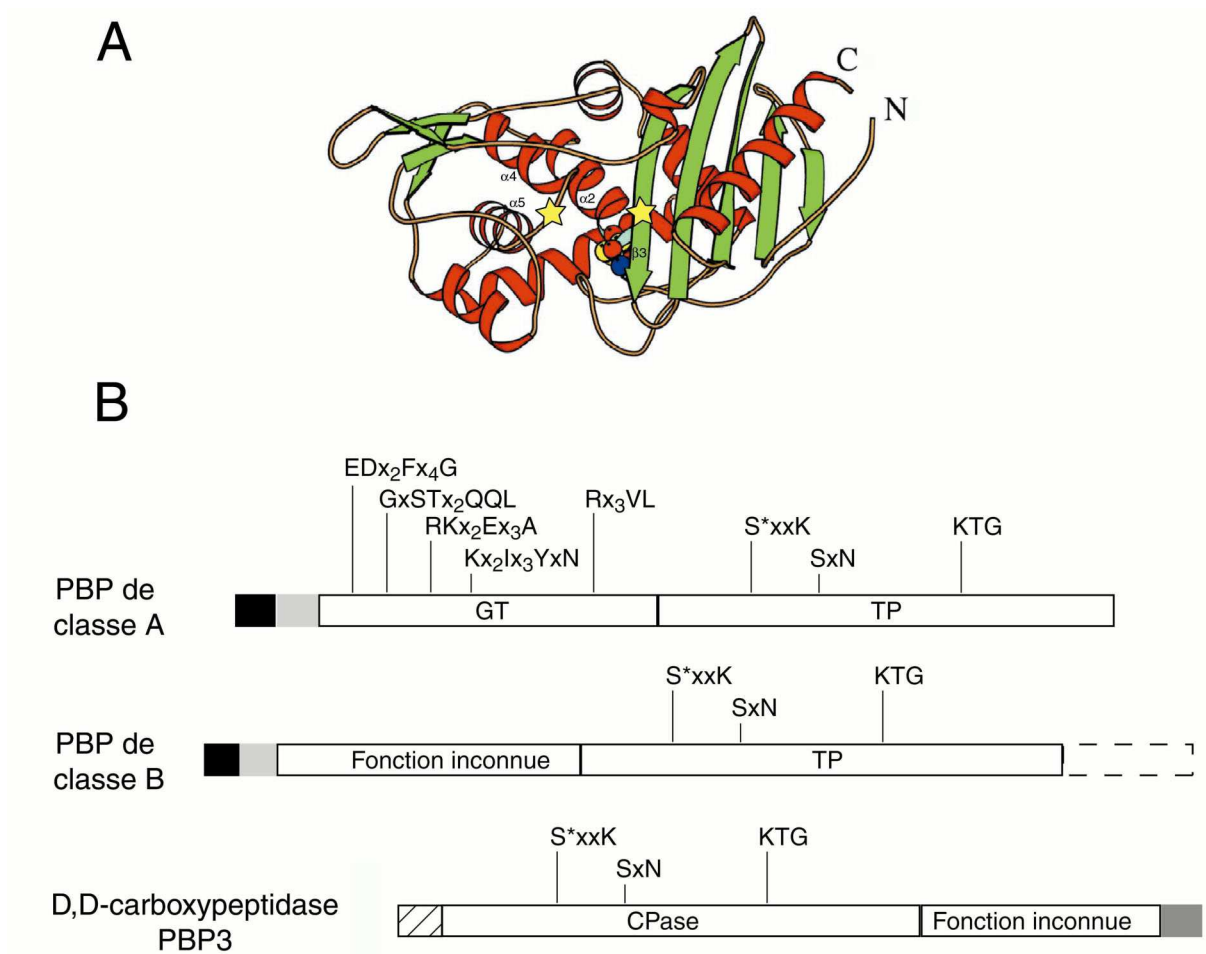
formation d'une liaison peptidique entre l'avant-dernier D-Ala du peptide donneur et le groupe  $\alpha$ -aminé porté par le résidu accepteur (Figure 5). Chez *E. coli*, ce dernier est un acide diaminopimélique ; il s'agit d'une lysine chez *S. pneumoniae*. L'acylation d'une PBP/D,D-carboxypeptidase s'effectue selon le mécanisme décrit ci-dessus mais l'acyl-enzyme est ensuite hydrolysé (Figure 5).

D'autres enzymes sont nécessaires à la maturation du polymère : des transglycosylases lytiques assurent le clivage des chaînes polysaccharidiques du PG (rôle essentiel lors de la division), des D,D-carboxypeptidases enlèvent le résidu D-Alanine terminal des chaînes pentapeptidiques permettant de réguler le nombre des interconnexions, et des endopeptidases catalysent le clivage des pontages peptidiques. Les activités transpeptidase et D,D-carboxypeptidase sont inhibées par les antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines et sont catalysées, ainsi que la transglycosylation, par les enzymes qui fixent ces mêmes antibiotiques, les PBPs ou « Penicillin-Binding Proteins ».

### III. La famille des Penicillin-Binding Proteins (PBPs)

#### III.1. Fonctions enzymatiques associées aux PBPs et classification des PBPs

Les enzymes appartenant à la superfamille de protéines appelée ASPRE pour Active-Serine Penicillin Recognizing Enzymes ont la capacité de rompre la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame des pénicillines en établissant une liaison ester entre la sérine catalytique de leur site actif et l'antibiotique, ce qui résulte en un complexe penicilloyl-enzyme stable (Gordon *et al.*, 1999; Joris *et al.*, 1988). Dans le site actif de ces protéines sont présents trois motifs catalytiques conservés qui constituent la signature caractéristique de la fonction de liaison aux  $\beta$ -lactamines (Figure 6A). Le premier motif, positionné du côté N-terminal d'une longue hélice ( $\alpha_2$ ), est constitué par la tétrade S\*-X-X-K qui porte la sérine active (S\*). Le second motif, composé de la triade S/Y-X-N, est situé sur la région charnière entre deux hélices  $\alpha$  ( $\alpha_4$  et  $\alpha_5$ ) et le troisième motif, formé par la triade K/H-S/T-G, est porté par un brin  $\beta$  ( $\beta_3$ ). La présence de ces trois motifs conservés chez les  $\beta$ -lactamases et les PBPs leur vaut d'appartenir, au sein de la grande famille des acyl enzymes transférase, à la superfamille de protéines ASPRE (Dideberg *et al.*, 1987; Jelsch *et al.*, 1993; Kelly et Kuzin, 1995; Pares *et al.*, 1996).



**Figure 6. Représentation en ruban d'un domaine transpeptidase (A) et représentation schématique de la topologie des PBPs de *S. pneumoniae* (B).** A : Domaine de liaison à la pénicilline de la D,D-transpeptidase de *Streptomyces* K15. Les brins  $\beta$  sont colorés en vert et les hélices en rouge, l'hélice 3-<sub>10</sub> est colorée en bleu, elle porte la sérine active du premier motif ASPRE, la sérine est représentée en Corey-Pauling-Koltun. Les étoiles jaunes indiquent la position des deux autres motifs ASPRE (Adapté de Fonzé *et al.*, 1999). B : Fonction associée aux différents domaines des PBPs de *S. pneumoniae*. Les motifs conservés des domaines GT et de liaison à la pénicilline (domaines TP ou CPase) sont indiqués. Les rectangles noirs et gris clair représentent respectivement les régions cytoplasmiques et les segments transmembranaires. Le rectangle en pointillés représente l'extension C-terminale de PBP2x. Chez PBP3, le rectangle hachuré correspond au peptide signal et le rectangle en gris clair à l'hélice C-terminale amphiphile.

Ancrées ou accolées à la membrane cytoplasmique via de courtes régions transmembranaires ou amphiphiles, les PBPs sont des enzymes mono- ou bi-fonctionnelles dont le(s) domaine(s) catalytique(s) se localise(nt) dans le périplasme. La conjonction de leur(s) activité(s) transglycosylase (GT), transpeptidase (TP) ou D,D-carboxypeptidase (D,D-CPase) permet la synthèse du PG ainsi que le remodelage de la paroi au cours de la croissance et de la division cellulaire. Sur la base de leur séquence en acides aminés et donc de leurs fonctions présumées, une classification en trois groupes a été établie (Ghuysen, 1991). La catégorie des PBPs de haute masse moléculaire est divisée en deux classes, la classe A étant

constituée d'enzymes bi-fonctionnelles possédant les activités GT et TP (Ishino *et al.*, 1980; Izaki *et al.*, 1968; Izaki *et al.*, 1966; Nakagawa *et al.*, 1979; Nakagawa *et al.*, 1984; Schwartz *et al.*, 2001) et la classe B d'enzymes mono-fonctionnelles portant l'activité TP (Figure 6B) (Ishino et Matsushashi, 1981; Izaki *et al.*, 1968). Enfin, des activités D,D-endopeptidase ou D,D-CPase ont été montrées pour le groupe des PBPs de faible masse moléculaire (Figure 6B) (Amanuma et Strominger, 1980; Matsushashi *et al.*, 1979). Un tableau de classification des différentes PBPs chez *S. pneumoniae*, *E. coli* et *B. subtilis* est donné en annexe A.

Les domaines protéiques portant les activités TP et D,D-CPase possèdent les trois motifs conservés de la famille ASPRE (Figure 6B) (Davies *et al.*, 2001; Fonze *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 1985; Pares *et al.*, 1996).

Les domaines portant l'activité GT possèdent eux aussi une signature caractéristique (Figure 6B) (Ghuysen, 1994; Goffin et Ghuysen, 1998). Cette dernière est composée de cinq motifs conservés qui sont :

- E-D-X<sub>2</sub>-F-X<sub>4</sub>-G
- R-K-X<sub>2</sub>-E-X<sub>3</sub>-A
- R-X<sub>3</sub>-V-L
- G-X-S-T-X<sub>2</sub>-Q-Q-L
- K-X<sub>2</sub>-I-X<sub>3</sub>-Y-X-N

Le séquençage complet de différents génomes d'eubactéries a mis en évidence une grande disparité dans le nombre, la taille, et la séquence des PBPs entre chaque espèce bactérienne. Une classification basée sur une comparaison de la séquence de toutes les PBPs recensées jusqu'alors a été établie en 1998, elle permet de classer les gènes de PBPs en sous-classes d'orthologues et de paralogues (Goffin et Ghuysen, 1998). Elle met en évidence l'existence d'un grand nombre de sous-classes de PBPs au sein d'une même espèce bactérienne.

## III.2. Les PBPs chez *Streptococcus pneumoniae*

### III.2.1. La classe A des PBPs de haute masse moléculaire

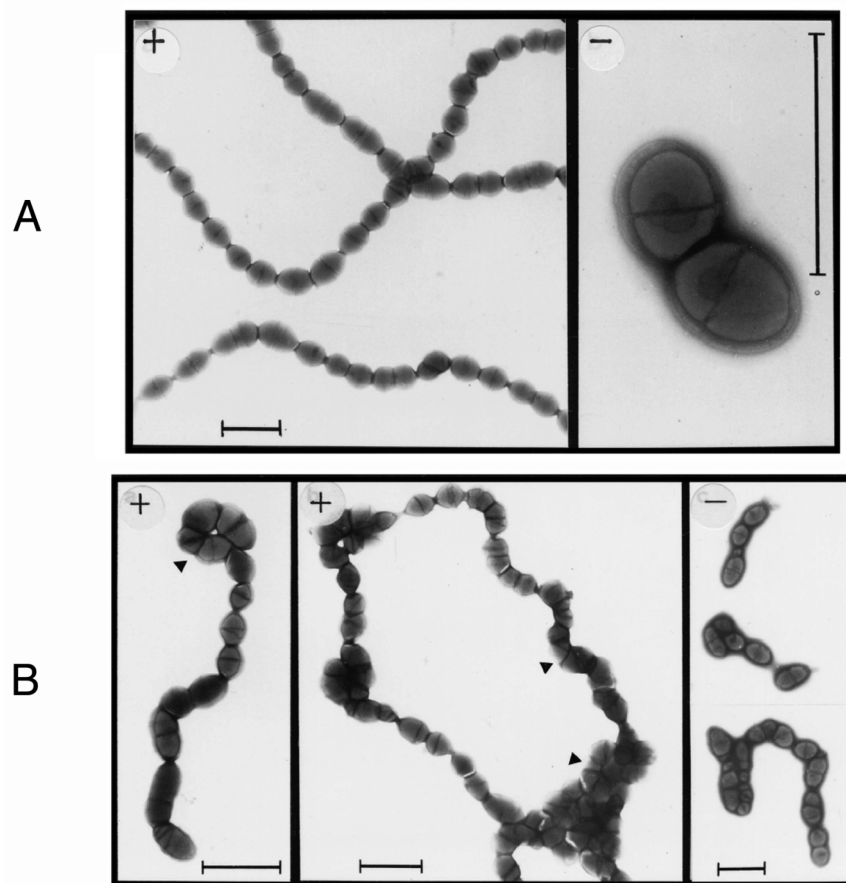
Chez *S. pneumoniae*, la classe A des PBPs est représentée par PBP1a, PBP2a et PBP1b qui comptent respectivement 719, 821 et 731 acides aminés (Hakenbeck *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1992). Les PBPs de classe A possèdent une région cytoplasmique N-terminale suivie d'une hélice hydrophobe transmembranaire puis d'une large région périplasmique divisée en deux domaines portant les activités GT et TP (Figure 6B) (Di Guilmi *et al.*, 2003; Di Guilmi *et al.*, 1998; Di Guilmi *et al.*, 1999). Le domaine périplasmique N-terminal porte

les cinq motifs caractéristiques de l'activité GT. Cette activité a été mise en évidence pour PBP1a, PBP1b et PBP1c chez *E. coli* (Ishino *et al.*, 1980; Nakagawa *et al.*, 1984; Schiffer et Holtje, 1999; Schwartz *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 1980) et pour PBP2a chez *S. pneumoniae* (Di Guilmi *et al.*, 2003). Il a par ailleurs été démontré que le domaine GT de PBP1b du pneumocoque lie le lipide II, substrat de la réaction GT, et la moénomycine (Di Guilmi *et al.*, 2003), deux observations laissant supposer une activité GT pour cette autre PBP de classe A.

Le domaine C-terminal de liaison à la pénicilline des PBPs de classe A du pneumocoque porte les trois motifs conservés de la famille ASPRE, sa capacité de liaison aux  $\beta$ -lactamines a été étudiée de manière approfondie. Ce domaine est supposé porter la fonction TP bien que cette activité n'ait encore jamais été mise en évidence *in vitro*. Chez *S. pneumoniae*, l'activité enzymatique du domaine TP de PBP1a, PBP1b et PBP2a vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines a été caractérisée (Di Guilmi *et al.*, 2003; Di Guilmi *et al.*, 1998; Di Guilmi *et al.*, 1999). Le rôle de chacune des PBPs de classe A dans l'assemblage du polymère reste encore non élucidé.

Chez *E. coli* lorsque PBP1a est surexprimée, la longueur des cellules diminue alors que la surexpression de PBP1b s'accompagne d'un phénotype filamenteux (Charpentier *et al.*, 2002). PBP1a serait donc impliquée dans la septation et PBP1b dans l'élongation. Chez *B. subtilis*, la participation spécifique de PBP1 au processus de septation a été mise en évidence. La délétion de PBP1 s'accompagne d'une morphologie filamenteuse lorsque la souche mutante est cultivée en milieu pauvre en ions magnésium (Murray *et al.*, 1998), et la protéine se localise au site de division du bacille en état végétatif (qui ne sporule pas) (Pedersen *et al.*, 1999).

La plupart des bactéries possèdent plusieurs PBPs de classe A et la raison d'une telle multiplicité reste obscure, d'autant que certaines espèces telles que *Neisseria meningitidis* ou *Neisseria gonorrhoeae* ne possèdent qu'une seule PBP de classe A (Ropp et Nicholas, 1997). Chez *E. coli*, la délétion du gène codant pour PBP1a ou du gène codant pour PBP1b est tolérée mais la double délétion de ces gènes est létale (Kato *et al.*, 1985; Suzuki *et al.*, 1978; Yousif *et al.*, 1985). Chez *S. pneumoniae*, les trois PBPs de classe A peuvent être inactivées individuellement sans perturbation apparente de la croissance et de la division bactérienne. Ceci démontre que chacune des PBPs de classe A n'est pas essentielle à la viabilité de *S. pneumoniae*, l'activité de l'une ou des deux PBPs restantes compensant probablement l'inactivation de la troisième. En revanche, les doubles mutants dans les gènes codant pour PBP1a/PBP1b et PBP2a/PBP1b sont viables mais présentant des anomalies au niveau du positionnement du septum (Figure 7).



**Figure 7. Effet de l'inactivation des PBPs de classe A de *S. pneumoniae*.** Observation par microscopie électronique après coloration négative de cellules d'une souche de pneumocoque sauvage (A) et d'une souche délétée de PBP1b et PBP2a (B) cultivées en absence (-) ou en présence (+) de 2% de choline. B : Noter la taille irrégulière des cellules et les angles de septation aberrants (pointes de flèches). La barre de mesure représente 2  $\mu\text{m}$  (D'après Paik *et al.*, 1999).

Enfin, la double inactivation de PBP1a et PBP2a est probablement létale car elle n'a pas pu être obtenue (Paik *et al.*, 1999). Malgré la redondance fonctionnelle des PBPs de classe A, une combinaison minimum composée des PBP1a et PBP1b chez *E. coli* et des PBP1a et PBP2a chez *S. pneumoniae* est donc nécessaire à la survie des deux bactéries : soit la troisième PBP de classe A est incapable de remplacer les deux autres, soit son activité ne suffit pas à assurer une synthèse viable de PG. Il est également possible que chez *S. pneumoniae* comme chez *E. coli*, la complémentation fonctionnelle entre les PBPs de classe A soit favorisée par les conditions de culture en laboratoire, celles-ci étant généralement assez éloignées des conditions naturelles de croissance de ces microorganismes. Le cas de *Bacillus subtilis* est particulier puisqu'en absence de toutes les PBPs de classe A identifiées, la bactérie est toujours viable et capable de synthétiser du PG (McPherson et Popham, 2003). Il est possible qu'il existe une (d')autre(s) PBP(s) de classe A chez *B. subtilis* qui n'ait(ent) pas encore été identifiée(s) ; dans le cas contraire, l'activité GT pourrait être assurée par un

complexe protéique ou une protéine n'appartenant pas à la famille des PBPs. Toutefois, aucun produit de gène présentant des similarités avec le domaine GT des PBPs de classe A n'a encore été mis en évidence.

L'activité GT est essentielle à la survie bactérienne puisque l'intégrité du PG repose, entre autre, sur la polymérisation des chaînes polysaccharidiques. Face à la résistance bactérienne croissante aux  $\beta$ -lactamines, la mise au point d'antibiothérapies ciblant l'activité GT constitue donc une alternative attractive à l'inhibition classique de l'activité TP.

### III.2.2. La classe B des PBPs de haute masse moléculaire

Comme les membres de la classe A des PBPs de haute masse moléculaire, la topologie des membres de la classe B est conservée au sein du monde bactérien : une hélice transmembranaire relie une courte région cytoplasmique, située à l'extrémité N-terminale des protéines, à un domaine périplasmique (Figure 6B). Ce dernier est constitué d'une région N-terminale de fonction inconnue et d'un domaine C-terminal de liaison à la pénicilline (domaine TP). Ce domaine est supposé porter l'activité TP mais comme pour les PBPs de classe A, cette dernière n'a jamais été démontrée *in vitro* vis-à-vis de peptides analogues de précurseurs du PG. Les plus proches analogues de substrat disponibles à ce jour sont pourtant des peptides aminopimelyl-D-alanyl-D-alanine et aminohexanoyl-D-alanyl-D-alanine mono ou diacétylés (Anderson *et al.*, 2003) dont la structure n'est plus très éloignée des substrats naturels des enzymes. Il est possible que la conformation du site actif du domaine TP soit maintenue *in vivo* par une interaction des PBPs avec un ou plusieurs partenaires protéiques potentiels. Sans cet environnement naturel, la conformation modifiée du site actif ne permettrait plus d'interaction fonctionnelle avec ces analogues de substrat, seule la liaison aux  $\beta$ -lactamines serait encore possible (Anderson *et al.*, 2003). L'étude de l'interaction du domaine TP des PBPs avec les  $\beta$ -lactamines est effectivement beaucoup plus aisée. Cet axe de recherche a fortement aidé à la compréhension du mécanisme réactionnel de la transpeptidation.

Les deux PBPs de classe B identifiées chez *S. pneumoniae*, PBP2x et PBP2b, comptent respectivement 750 et 680 acides aminés. L'échec de la tentative d'inactivation de PBP2x ou de PBP2b montre que ces enzymes sont essentielles à la survie de *S. pneumoniae* (Kell *et al.*, 1993). Elles portent sur leur région périplasmique C-terminale les trois motifs caractéristiques de la famille ASPRE. En aval du domaine TP, PBP2x possède en plus une



extension C-terminale, rare parmi les PBPs de haute masse moléculaire, qui n'a pas de fonction connue (Figure 6B) (Pares *et al.*, 1996). PBP2x étant une cible primaire de la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez le pneumocoque, la protéine issue d'une souche sensible à ces antibiotiques ainsi que de nombreux variants issus de souches résistantes ont fait l'objet d'études biochimiques (Chesnel *et al.*, 2002; Jamin *et al.*, 1993; Mouz *et al.*, 1999; Mouz *et al.*, 1998) et structurales (Chesnel *et al.*, 2003; Dessen *et al.*, 2001; Gordon *et al.*, 2000; Pares *et al.*, 1996). PBP2x et PBP2b présentent une activité de liaison aux  $\beta$ -lactamines et une activité thiolestérase vis-à-vis de l'analogue de substrat S2d (Jamin *et al.*, 1993; Mouz *et al.*, 1999; Pagliero *et al.*, 2003).

Aucune activité GT n'a été démontrée pour les PBPs de classe B qui possèderaient donc une fonction unique TP, le rôle exact de ces protéines dans le processus de néo-synthèse du PG n'a pas encore été élucidé. Les génomes bactériens codent généralement pour deux PBPs de classe B, l'une étant impliquée dans la croissance de la bactérie et l'autre dans le processus de division. Le gène de PBP2x se localise dans le groupe de gènes *dcw* (division and cell wall) codant pour des protéines impliquées dans la synthèse de la paroi et la division cellulaire (Massidda *et al.*, 1998). Cette localisation suggère que PBP2x pourrait être impliquée dans la synthèse du PG septal au cours de la division cellulaire, PBP2b interviendrait donc dans la phase de croissance de la paroi.

Chez toutes les bactéries, à un nombre donné de PBPs de classe B correspond un même nombre de protéines de la famille SEDS (« Shape, Elongation, Division and Sporulation »), protéines impliquées dans les processus de croissance et de division bactérienne (Matsushashi *et al.*, 1990). Chaque PBP de classe B fonctionnerait de pair avec une protéine SEDS. Chez *S. pneumoniae*, le couple intervenant au cours de la croissance serait constitué de RodA et PBP2b et celui intervenant au cours de la division cellulaire de FtsW et PBP2x. Ce dernier est présenté dans la dernière partie de cette présentation bibliographique. Les bactéries présentant des cycles de vie complexes et des modes de division alternatifs tels que la sporulation ou la division du mycélium (*Streptomyces*) possèdent des paires PBP de classe B/ protéine SEDS supplémentaires.

### III.2.3. Les PBPs de faible masse moléculaire

Les PBPs de faible masse moléculaire sont des endopeptidases ou des D,D-CPases qui ne sont pas essentielles à la survie de la bactérie (Denome *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 1990).

*E. coli* compte 6 PBPs de faible masse moléculaire. 3 d'entre elles (PBP4, PBP7 et PBP8) possèdent une activité D,D-endopeptidase qui hydrolyse le pontage peptidique entre l'acide diaminopimelique et la D-alanine. Parmi les 4 autres (PBP4, PBP5, PBP6 et PBP6b) qui sont des D,D-Cpases, PBP5 est impliquée dans le maintien de la morphologie d'*E. coli* (Nelson et Young, 2001; Nelson et Young, 2000).

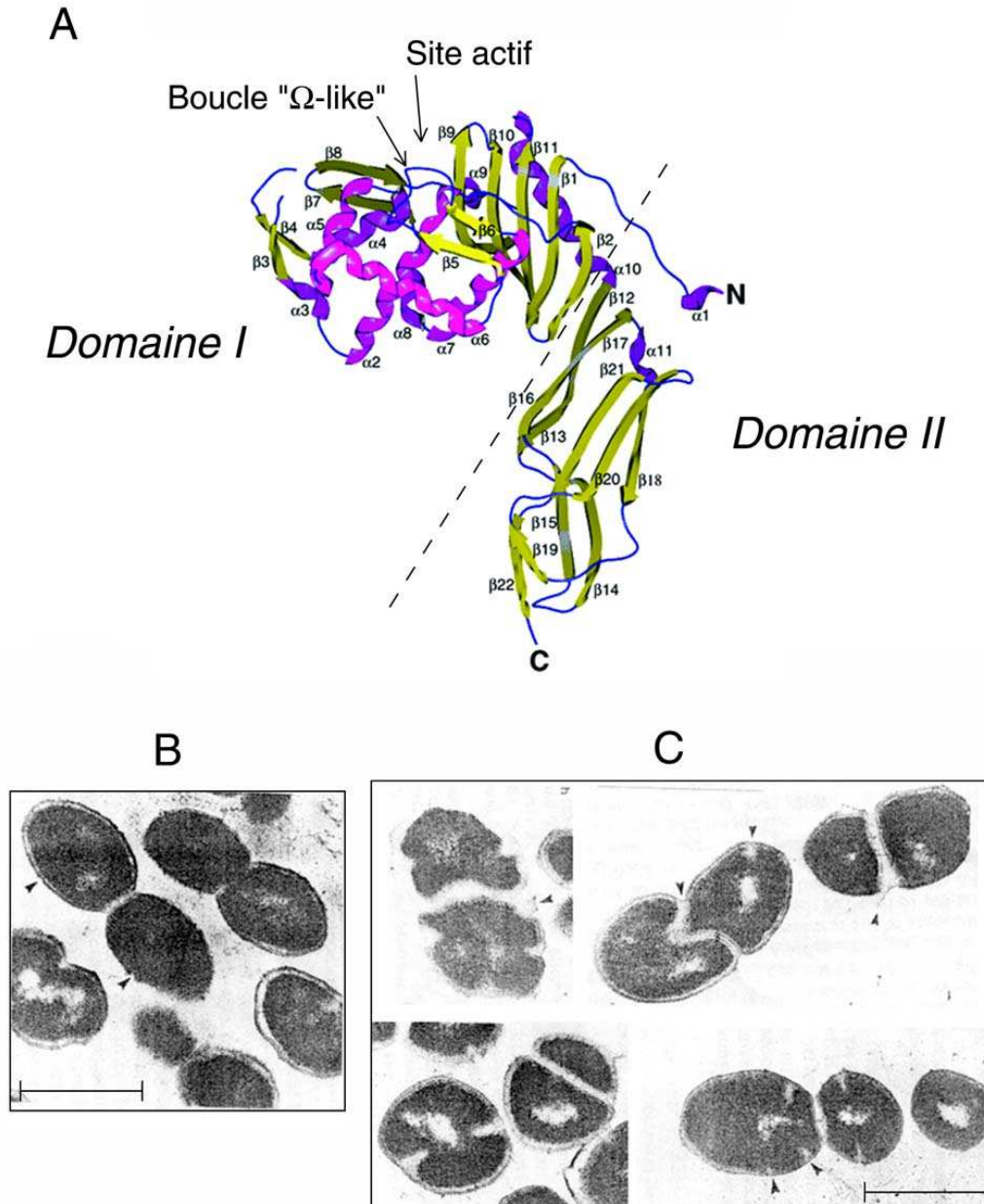
La seule PBP de faible masse moléculaire de *S. pneumoniae*, PBP3, est homologue de PBP5 d'*E. coli*. Le gène *dacA* code pour le précurseur de PBP3, une protéine de 413 résidus, dirigé vers la membrane interne via un peptide signal N-terminal clivable (Figure 6B). La maturation du précurseur au cours de sa translocation vers le périplasme résulte en une protéine de 392 résidus, PBP3, qui s'associe à la membrane par l'intermédiaire d'une vingtaine de résidus C-terminaux. Il a été prédit que ces mêmes résidus C-terminaux chez PBP5 d'*E. coli* formerait une hélice  $\alpha$  amphiphile (Jackson et Pratt, 1987; Phoenix, 1990).

PBP3 et PBP5 sont capables de se lier aux  $\beta$ -lactamines. Contrairement à PBP3 et à la plupart des PBPs, PBP5 possède une activité d'hydrolyse des  $\beta$ -lactamines relativement élevée (Nicholas et Strominger, 1988). PBP3 et PBP5 possèdent une activité D,D-CPase *in vitro* (Amanuma et Strominger, 1980; Hakenbeck et Kohiyama, 1982; Tamura *et al.*, 1976) et *in vivo* (Matsushashi *et al.*, 1979; Severin *et al.*, 1992). Cette activité est caractérisée par le clivage du dernier résidu D-Ala de la chaîne pentapeptidique du PG et a été mise en évidence pour PBP3 par incubation d'extraits membranaires de la protéine avec un substrat UDP-muramyl[A<sub>2</sub>pm-<sup>3</sup>H]-pentapeptide (Hakenbeck et Kohiyama, 1982).

### III.2.3.1. Structure tri-dimensionnelle de PBP5 d'*E. coli*

La structure tridimensionnelle du mutant sPBP5' de PBP5 a été résolue à 2.3 Å de résolution (Davies *et al.*, 2001). Le préfixe « s » indique une délétion des 17 derniers acides aminés C-terminaux, cette délétion augmente la solubilité de la protéine (Nicholas et Strominger, 1988). L'apostrophe indique la substitution de la glycine 105 par un aspartate, cette mutation s'accompagne d'une forte diminution de la vitesse d'hydrolyse  $\beta$ -lactamines (Amanuma et Strominger, 1984). sPBP5' est composée de deux domaines I et II orientés en angle droit et qui semblent relativement fixes l'un par rapport à l'autre (Figure 8A) (Davies *et al.*, 2001). L'hélice C-terminale amphiphile est absente dans la forme cristallisée de PBP5 mais il est vraisemblable qu'elle viendrait se positionner à la base du domaine II et se déploierait sur la surface externe de la membrane cytoplasmique (Figure 9). Le domaine

globulaire N-terminal (domaine I) inclut le site actif de la protéine où sont présents les trois motifs caractéristiques de la famille ASPRE. Le repliement du domaine II C-terminal ne présente aucune similarité avec une structure protéique connue et son rôle n'a toujours pas été élucidé.



**Figure 8. Représentation en ruban de la structure de sPBP5' d'*E. coli* (A) et effet de l'inactivation de PBP3 de *S. pneumoniae* (B et C).** A : Le domaine I de liaison à la pénicilline est orienté en angle droit par rapport au domaine II dont la fonction est inconnue. Le trait en pointillés marque la limite entre les deux domaines. Le site actif de sPBP5' est bordé par un feuillet  $\beta$  composé de 5 brins anti-parallèles et un entrelacement d'hélices  $\alpha$ , son entrée se situe sur le haut du domaine I. La boucle «  $\Omega$ -like » impliquée dans l'activité de déacylation se situe entre les brins  $\beta 5$  et  $\beta 6$  (D'après Davies *et al.*, 2001). B-C : Observation par microscopie électronique d'une coupe longitudinale de cellules d'une souche de pneumocoque sauvage (B) et d'une souche déficiente en activité D,D-CPase (C). Les pointes de flèches montrent les septa en croissance. C : Noter l'élargissement des cellules, l'apparition de septa sur différents plans de la cellule et l'épaisseur inégale de la couche de PG dans la souche mutante. La barre de mesure représente 1  $\mu\text{m}$  (D'après Schuster *et al.*, 1990).

### III.2.3.2. Fonctions enzymatique et cellulaire des PBPs de faible masse moléculaire

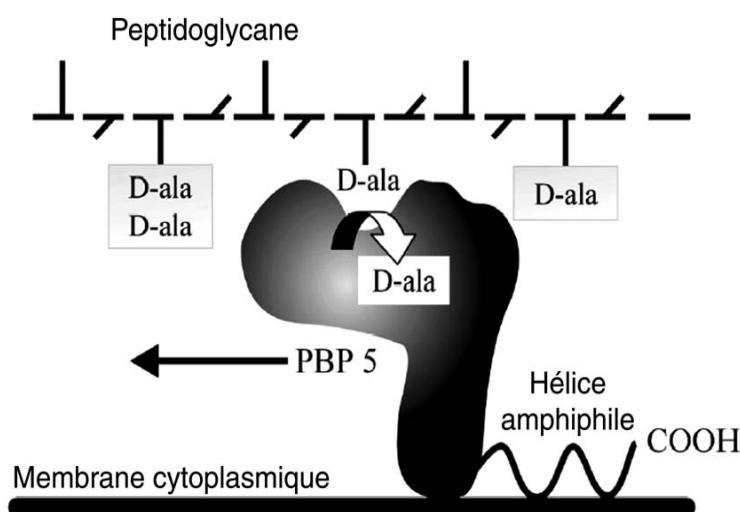
L'inhibition spécifique des PBPs de faible masse moléculaire par des antibiotiques n'entrave pas la viabilité cellulaire (Hakenbeck *et al.*, 1980; Spratt et Cromie, 1988; Zighelboim et Tomasz, 1980). Par ailleurs, des souches d'*E. coli* et de *S. pneumoniae* dans lesquelles sont respectivement inactivées PBP5 et PBP3 ont été obtenues (Nelson et Young, 2001; Schuster *et al.*, 1990; Spratt, 1980). Ces deux observations indépendantes permettent de conclure que les CPases ne sont pas essentielles à la survie bactérienne. Toutefois, ces souches mutantes présentent de sévères aberrations morphologiques (Nelson et Young, 2001; Nelson et Young, 2000; Schuster *et al.*, 1990). Chez le pneumocoque, les anomalies les plus significatives sont une apparition de multiples septa témoignant d'une désorganisation de la division, un élargissement des cellules qui adoptent une morphologie sphérique et un temps de génération pratiquement double de celui de la souche sauvage (Figure 8B et C) (Schuster *et al.*, 1990). Une modification de la composition chimique du PG, compatible avec une déficience en activité D,D-CPase, est également observée chez les mutants *dacA-* de pneumocoque ou lorsqu'une souche sauvage est cultivée en présence d'acide clavulanique, inhibiteur spécifique de PBP3. Dans les deux cas, on observe une augmentation de la concentration en pentapeptides au détriment des tripeptides, majoritaires dans la souche sauvage (Severin *et al.*, 1992; Severin *et al.*, 1997).

Malgré ces diverses observations, les hypothèses concernant le rôle biologique des D,D-CPases se restreignent pour le moment à une régulation du degré de réticulation de la muréine et à une implication dans le maintien de la morphologie cellulaire (Holtje, 1998; Nelson et Young, 2001; Schuster *et al.*, 1990).

Alors que l'activité D,D-CPase du domaine I a été mise en évidence, la fonction du domaine II est en revanche inconnue. Sur la base de la structure tridimensionnelle de sPBP5', Davies *et al.* avaient proposé deux hypothèses. Selon la première, le domaine II jouerait le rôle d'un piédestal qui positionnerait le site actif près des couches inférieures du PG, en position idéale pour une interaction avec les peptides de la paroi. Selon la deuxième, le domaine II interagirait avec d'autres enzymes de synthèse de la paroi afin de recruter PBP5 vers les zones de synthèse du PG (Davies *et al.*, 2001). En effet, les nombreuses structures  $\beta$  présentes sur ce domaine pourraient faciliter de telles interactions via des liaisons hydrogène établies entre des feuilletts  $\beta$ . Nelson *et al.* ont créé des protéines hybrides en échangeant les domaines I et II des D,D-CPases PBP5 et PBP6 d'*E. coli*. La protéine de fusion PBP 5I/6II

combinant le domaine I de PBP5 avec le domaine II de PBP6 parvient à compléter la délétion de PBP5 (Nelson *et al.*, 2002). Il en résulte que soit le domaine II ne participe à aucune interaction protéique et permet uniquement d'élever le site actif à une distance déterminée au-dessus de la membrane interne, soit que PBP5 et PBP6 participent au même complexe protéique (Nelson *et al.*, 2002). En ce qui concerne le domaine I, la création d'hybrides échangeant de courtes régions de ce domaine entre PBP5 et PBP6 a montré qu'une zone restreinte située autour du motif catalytique KTG déterminait la spécificité de PBP5. Il ressort de ces expériences que la morphologie cellulaire d'*E. coli* dépend essentiellement de l'activité enzymatique de PBP5 et de l'accessibilité du substrat à son site actif (Ghosh et Young, 2003).

Le rôle exact joué par l'hélice amphiphile des CPases reste assez obscur. Sa fonction première est d'associer les enzymes à la membrane cytoplasmique. En effet, lorsque PBP3 de *S. pneumoniae* et PBP5 d'*E. coli* sont déléguées de leur hélice amphiphile, les protéines ne sont plus associées à la membrane et sont libérées dans le milieu de culture pour la première et dans le périplasma pour la seconde (Pratt *et al.*, 1986; Schuster *et al.*, 1990). Par ailleurs, Nelson *et al.* ont montré que la viabilité d'une souche d'*E. coli* était compromise lorsqu'elle exprimait une PBP5 déléguée de son hélice amphiphile (Nelson et Young, 2001). Les auteurs en déduisent que l'association membranaire de PBP5 est nécessaire au contrôle exercé par la CPase sur la morphologie de la cellule en permettant de réguler le nombre de muopeptides accessibles à la protéine. Ils proposent que l'hélice amphiphile associée à la membrane restreindrait l'accès de PBP5 aux seules chaînes pentapeptidiques orientées vers la membrane interne (Figure 9) (Nelson et Young, 2001).



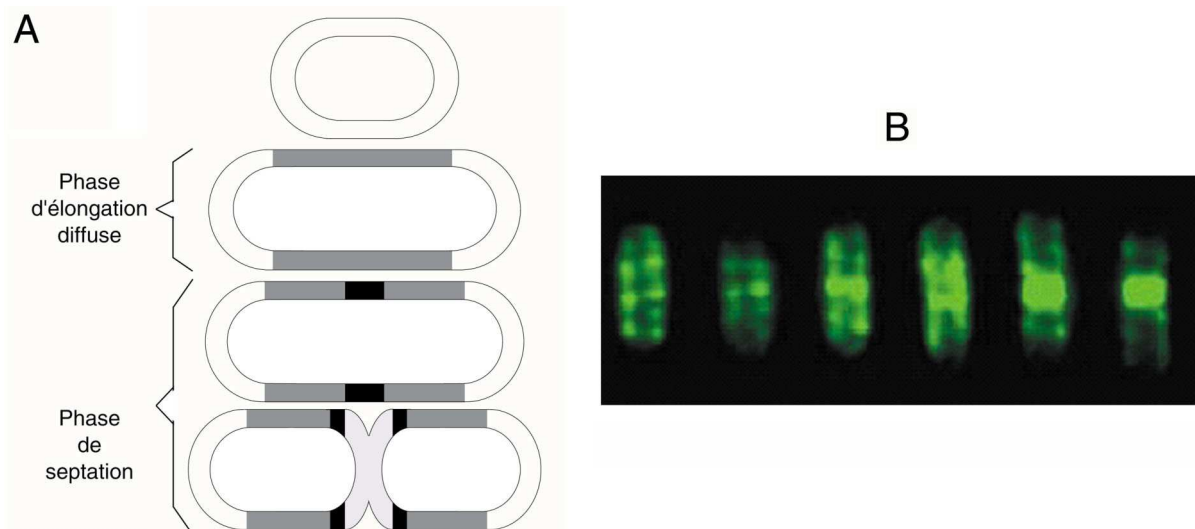
**Figure 9. Positionnement spéculatif de la D,D-carboxypeptidase PBP5 dans le périplasma d'*E. coli*.** La représentation schématique de PBP5 est basée sur la structure tri-dimensionnelle de la protéine résolue par Davies *et al.* en 2001. La protéine est associée à la membrane cytoplasmique par son hélice C-terminale amphiphile qui est absente dans le mutant sPBP5' dont la structure a été résolue. L'entrée du site actif se situe sur le haut de la protéine, face à la couche de PG. PBP5 se déplacerait et cliverait les résidus D-Ala terminaux des chaînes peptidiques du PG orientées vers la membrane interne (D'après Nelson and Young, 2001).

Des expériences échangeant l'hélice amphiphile de PBP5 avec celles des trois autres CPases d'*E. coli*, PBP6, PBP4 et DacD ont été réalisées (Nelson *et al.*, 2002). L'expression des hybrides de PBP5 avec PBP6 ou DacD ne s'accompagne pas d'un phénotype particulier, montrant ainsi que la capacité de l'hélice amphiphile à s'associer à la membrane plasmique repose non pas sur sa structure primaire mais sur sa structure tertiaire (Nelson *et al.*, 2002). Bien qu'associé à la membrane cytoplasmique, l'hybride de PBP5 avec PBP4 s'est révélé déficient en activité CPase, montrant que l'association membranaire est nécessaire mais pas suffisante à la fonction physiologique de PBP5 (Nelson *et al.*, 2002). Il se pourrait donc que l'hélice amphiphile établisse des interactions protéiques au sein d'un complexe multi-enzymatique, ou qu'elle soit impliquée dans le positionnement de la CPase dans le périplasme (Nelson *et al.*, 2002).

## **IV. Modèles de synthèse du peptidoglycane pour les bacilles et les coques**

### **IV.1. Synthèse du peptidoglycane chez les bacilles**

Un cycle de génération chez les bacilles est composé de deux phases différentes et successives de synthèse du PG, l'élongation et la septation (Ayala *et al.*, 1994; Cooper, 1991). L'élongation consiste en une synthèse diffuse de PG sur toute la surface de la bactérie excepté aux pôles de la cellule (de Pedro *et al.*, 1997), elle permet de doubler la quantité de PG et de générer le matériel nécessaire à la formation de deux cellules filles (Figure 10A). Récemment, l'observation à haute résolution de néo-PG marqué par de la vancomycine fluorescente, a montré que le mode d'insertion du polymère que l'on croyait diffus au cours de l'élongation chez *B. subtilis* est en fait hélicoïdal (Figure 10B) (Vicente et Lowe, 2003). L'application de ces techniques photographiques à haute résolution chez d'autres bacilles devrait permettre de vérifier si ce phénomène est spécifique ou non à *B. subtilis*. A l'étape d'élongation succède l'étape de septation au cours de laquelle une « cloison » de PG, le septum, est synthétisée au site de division de la bactérie, entre les deux futures cellules filles (Figure 10A) (de Pedro *et al.*, 1997).

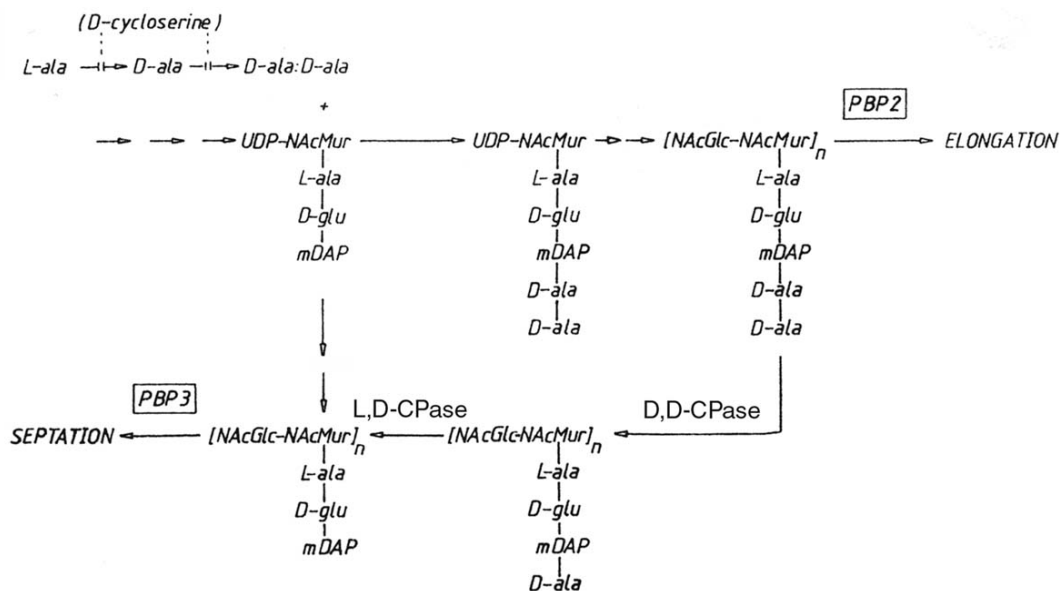


**Figure 10. Synthèse du peptidoglycane chez les bacilles.** A : La phase d'élongation chez les bacilles consisterait en une insertion diffuse de néo-PG (gris foncé) sur toute la région cylindrique de la bactérie excepté aux pôles de la cellule. Au cours de la septation, du néo-PG est inséré en périphérie du site de division (noir) et une cloison de PG (gris clair) est synthétisée au centre de la cellule en division. B : Marquage par de la vancomycine fluorescente du PG nouvellement synthétisé chez *B. subtilis*. Au cours de l'élongation, le néo-PG décrit une ellipse sur la région cylindrique du bacille, au cours de la septation le néo-PG est inséré au niveau du site de division (D'après Vicente and Löwe, 2003).

Chez *E. coli*, les transpeptidases PBP2 et PBP3 sont les deux PBPs de classe B. L'inactivation de PBP2 confère une morphologie sphérique aux cellules mutantes et la protéine se localise de manière diffuse sur toute la partie cylindrique d'*E. coli* au cours de l'élongation (Den Blaauwen *et al.*, 2003). Ces deux observations montrent l'implication de PBP2 au niveau du processus d'élongation (de Pedro *et al.*, 2001; Spratt et Pardee, 1975). Le phénotype filamentueux de mutants dans lesquels la transpeptidase PBP3 (FtsI) est inactivée (Botta et Park, 1981; Spratt, 1975; Spratt et Pardee, 1975), le couplage génétique de PBP3 avec la protéine de division FtsW (Hara *et al.*, 1997), ainsi que la localisation exclusive de PBP3 au site de division (Wang *et al.*, 1998) ont montré que cette protéine catalyse la synthèse de PG septal et qu'elle n'intervient pas au cours de l'élongation. L'inactivation temporaire de PBP3 a par ailleurs montré que la septation consiste dans un premier temps en une synthèse de PG indépendante de PBP3 en périphérie du futur septum (synthèse périphérique) (de Pedro *et al.*, 1997; Nanninga, 1991; Wientjes et Nanninga, 1989). PBP3 n'intervient donc que tardivement dans le processus de septation. La synthèse périphérique de PG pourrait impliquer PBP2, localisée au milieu de la cellule dès le début de la septation, ainsi que des PBPs bi-fonctionnelles (PBP1a et/ou PBP1b) (Den Blaauwen *et al.*, 2003).

## IV.2. Relations entre la composition du peptidoglycane et la croissance d'*E. coli*

Une évolution de la composition du PG en fonction de son âge bio-synthétique été observée chez *E. coli*. Le néo-PG contient des unités pentapeptidiques et il possède un plus faible degré de réticulation que l'ancien PG (de Pedro et Schwarz, 1981). Au cours de l'élongation, le PG nouvellement inséré est majoritairement réticulé par des dimères tétra-térapeptidiques alors que l'ancien PG contient principalement des dimères tri-térapeptidiques, également majoritaires dans le PG septal (Glauner et Holtje, 1990; Pisabarro *et al.*, 1986). Une augmentation de l'activité L,D-CPase a par ailleurs été observée au début de la phase de septation (Beck et Park, 1976; Mirelman *et al.*, 1978). Il semblerait donc que PBP3 utilise préférentiellement les chaînes tripeptidiques comme accepteurs de la réaction de transpeptidation. Ces observations ont conduit à proposer un modèle dans lequel des penta ou térapeptides seraient disponibles et utilisés comme accepteurs par PBP2 au cours de d'élongation, et des tripeptides seraient disponibles et utilisés comme accepteurs par PBP3 au cours de la septation (Figure 11). Ainsi, le basculement de la phase d'élongation vers la phase de septation serait déclenché par l'augmentation de la teneur du PG en tripeptides, donc de l'intervention des D,D- et L,D-CPases et des enzymes impliquées dans la synthèse des dipeptides D-Ala-D-Ala (Begg *et al.*, 1990; Mirelman *et al.*, 1977; Pisabarro *et al.*, 1986).

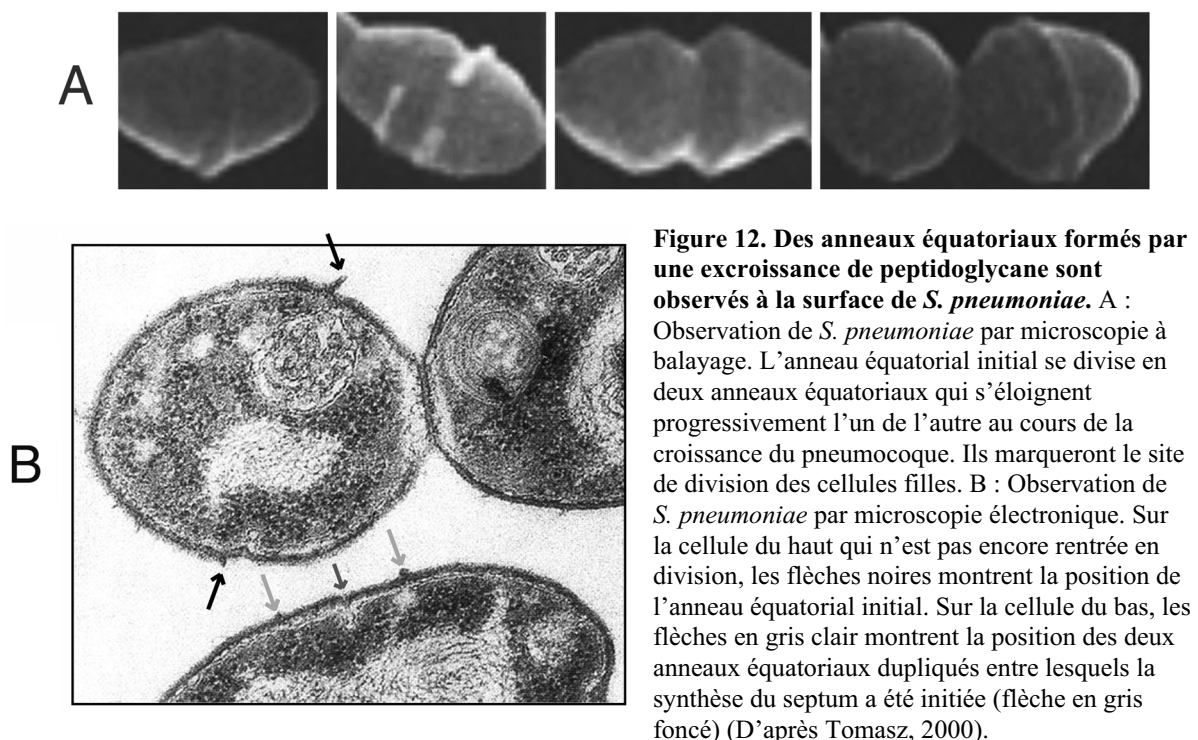


**Figure 11. Composition peptidique du peptidoglycane au cours de l'élongation et de la septation chez *E. coli*.** Au cours de l'élongation, PBP2 utiliserait des tétra ou des pentapeptides comme accepteurs de la réaction de transpeptidation. La formation du septum requiert l'activité transpeptidase de PBP3 qui n'utilise que des tripeptides comme accepteurs. La disponibilité en tripeptides dépend à la fois de l'activité de la D-cyclosérine, qui génère les dipeptides D-Ala-D-Ala, et de l'activité des D,D- et L,D- CPase qui enlèvent les résidus D-Ala-D-Ala des chaînes pentapeptidiques. La quantité disponible de tripeptides serait décisive pour le basculement de la phase d'élongation vers la phase de septation. (D'après Begg *et al.*, 1990)



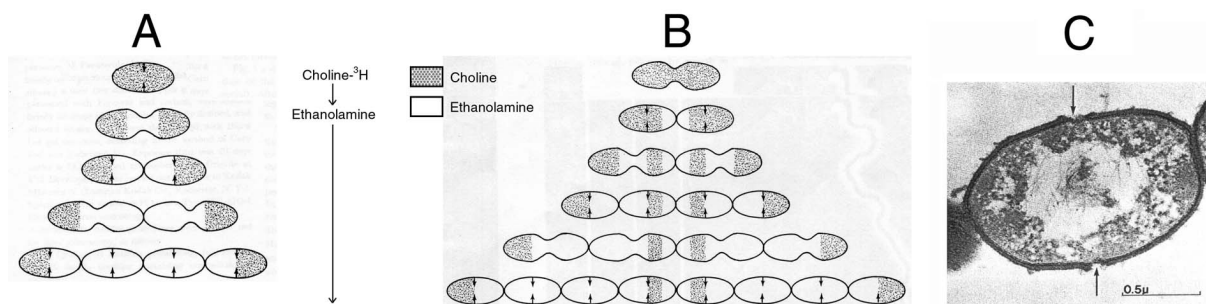
### IV.3. Synthèse du peptidoglycane chez les coques

Les sites et le mode d'insertion du néo-PG chez *S. pneumoniae* comme chez tous les coques Gram+ sont très mal connus. Lorsque le pneumocoque est observé en microscopie électronique ou à balayage (Figure 12), on observe à sa surface la présence d'un anneau équatorial formé par une excroissance de PG (Tomasz, 2000; Tomasz *et al.*, 1964). Au cours de la croissance de la bactérie, cet anneau équatorial initial est dupliqué en deux anneaux entre lesquels va être incorporé le néo-PG (Briles et Tomasz, 1970; Laitinen et Tomasz, 1990; Tomasz *et al.*, 1971). Les deux anneaux équatoriaux dupliqués vont se séparer et s'éloigner progressivement l'un de l'autre (Figure 12). Ils seront les marqueurs du futur site de division des deux cellules filles et seront à leur tour dupliqués au cours du cycle de division suivant (Tomasz, 2000).



La choline ou l'éthanolamine se greffent sur les acides téichoïques qui se lient aux précurseurs du PG dès que ces derniers sont synthétisés, ces composés sont donc incorporés simultanément au PG existant (Mosser et Tomasz, 1970; Tomasz, 1967; Tomasz *et al.*, 1975). Ainsi, les régions de néo-incorporation de choline ou d'éthanolamine peuvent être assimilées aux zones de néo-synthèse de muréine. Par ailleurs, lorsque de l'éthanolamine est incorporée à la place de la choline sur les acides téichoïques, les cellules ne parviennent plus à se séparer complètement à la fin d'un cycle de division et forment de longues chaînes (Mosser et Tomasz, 1970; Tomasz, 1968). Ce phénomène est réversible lorsque de la choline est à nouveau rajoutée au milieu de culture (Tomasz *et al.*, 1975). Ces différentes propriétés ont été

utilisées par Briles et Tomasz pour visualiser les zones de synthèse de la paroi au cours de plusieurs générations. L'observation de ces cellules par autoradiographie a montré que du néo-PG était incorporé dans les deux hémisphères situés de part et d'autre du septum (Figure 13A et 13B) mais n'a pas permis de déterminer si cette incorporation était diffuse ou localisée et s'il existait plus d'une zone de synthèse (Briles et Tomasz, 1970). Les auteurs suggèrent l'existence de trois zones de synthèses : une première zone « primaire » au niveau du septum et deux autres zones « secondaires » au niveau des anneaux équatoriaux dupliqués (Briles et Tomasz, 1970).

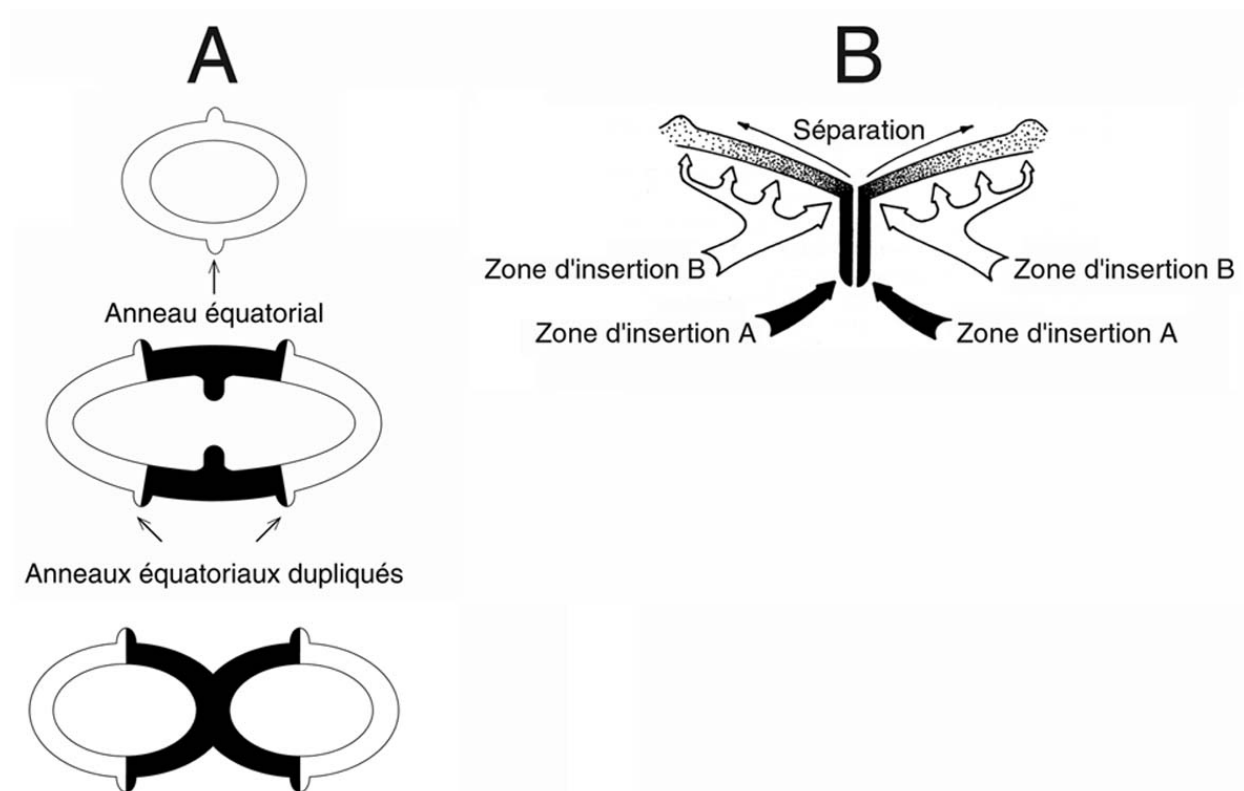


**Figure 13. Synthèse du peptidoglycane chez *S. pneumoniae*.** A-B : Représentations schématiques de la ségrégation du néo-PG chez *S. pneumoniae*. Une souche de pneumocoque est cultivée en présence de choline marquée au tritium, puis transférée dans un milieu contenant de l'éthanolamine froide, les étapes successives de croissance et de division sont montrées du haut vers le bas des pyramides. Le nouveau PG est synthétisé de part et d'autre du septum (flèches noires). Si la cellule n'est pas encore entrée en division au moment du changement de milieu, l'ancien PG qui contient de la choline est repoussé aux extrémités de la chaîne de pneumocoque en croissance (A), dans le cas inverse, il est repoussé vers le centre et aux extrémités de la chaîne (B). C : Cellules de pneumocoque cultivées en présence d'éthanolamine, transférées brièvement dans un milieu contenant de la choline, puis soumise à la digestion d'une amidase. Seul le néo-PG contenant de la choline a été digéré dans la région équatoriale de la cellule. (D'après Briles and Tomasz, 1970 et Laitinen and Tomasz, 1990).

La paroi du pneumocoque dépourvue de choline est résistante à l'action des amidases (Giudicelli et Tomasz, 1984; Holtje et Tomasz, 1975; Mosser et Tomasz, 1970). Cette propriété a permis de localiser les zones de néo-synthèse de la paroi (Figure 13C) et de confirmer l'incorporation de néo-PG dans la région située entre les deux anneaux équatoriaux dupliqués, sites de division des deux futures cellules filles (Figure 14A) (Laitinen et Tomasz, 1990).

Chez *Streptococcus pyogenes*, et *Enterococcus faecalis*, deux autres coques Gram+, des expériences de marquage fluorescent alternatif de la muréine ont montré que la synthèse de paroi s'effectue également dans une zone située entre le septum de la bactérie en division et les sites de septation des deux futures cellules filles (Cole et Hahn, 1962; Higgins *et al.*, 1971). Pour ces deux bactéries, il a été proposé qu'à chaque cycle de division corresponde un site de synthèse unique et localisé : le néo-PG serait incorporé en périphérie du septum, de

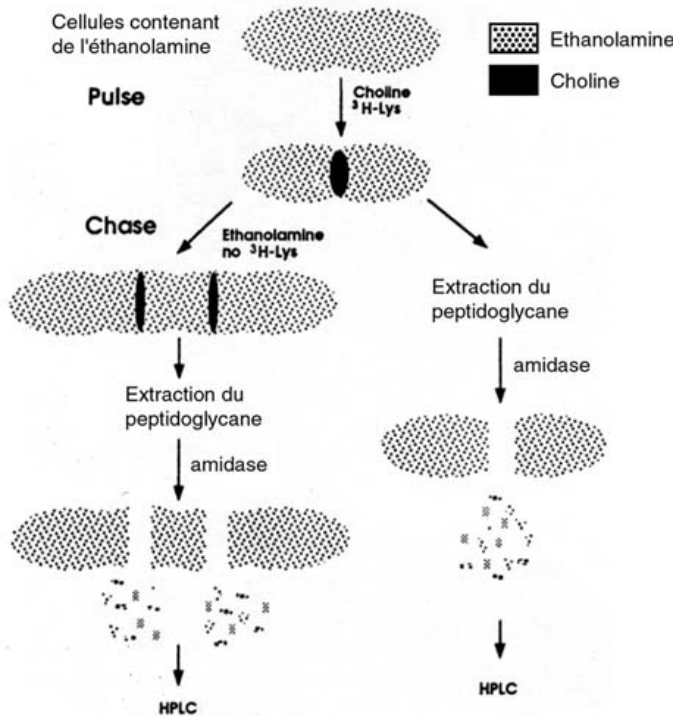
façon centripète (Cole et Hahn, 1962; Higgins *et al.*, 1971). Quelques modifications ont par la suite été apportées au modèle relatif à *E. faecalis*. Comme *S. pneumoniae*, *E. faecalis* possède des marqueurs de surface constitués d'excroissance de PG et dont la localisation équatoriale coïncide avec les sites de division successifs de la bactérie. Une approche mathématique de la synthèse pariétale d'*E. faecalis*, basée sur la mesure du volume cellulaire et de la quantité de muréine entre les deux anneaux équatoriaux dupliqués, a permis de déduire l'existence de deux zones d'insertion de néo-PG (Higgins et Shockman, 1970; Higgins et Shockman, 1976). Les précurseurs seraient d'abord assemblés au niveau du septum, la couche de PG septale périphérique serait ensuite séparée en deux pour générer les parois nécessaires à la formation des deux cellules filles (Figure 14B). Au niveau de la deuxième zone de synthèse, située entre le septum et les marqueurs de surface équatoriaux, une insertion diffuse de PG permettrait d'épaissir les nouvelles parois (Higgins et Shockman, 1970; Higgins et Shockman, 1976).



**Figure 14. Interprétation schématique de la synthèse du peptidoglycane chez *S. pneumoniae* (A) et chez *E. faecalis* (B).** A : Chez *S. pneumoniae*, du néo-PG (en noir) est incorporé dans la zone située entre les deux anneaux équatoriaux dupliqués. B : Le septum d'*E. faecalis* serait synthétisé à partir de la zone d'insertion A de précurseurs du PG. Le septum se diviserait en deux couches de PG constituant la nouvelle paroi des deux cellules filles. Des précurseurs du PG seraient insérés au niveau de la zone B afin d'épaissir les jeunes parois (D'après Laitinen and Tomasz, 1990 et Higgins and Shockman, 1976).

#### IV.4. Relations entre la composition du peptidoglycane et la croissance de *S. pneumoniae*

Les travaux de Laitinen et Tomasz en 1990 ont permis d'étudier la composition du PG en fonction de son âge bio-synthétique (Figure 15) (Laitinen et Tomasz, 1990).

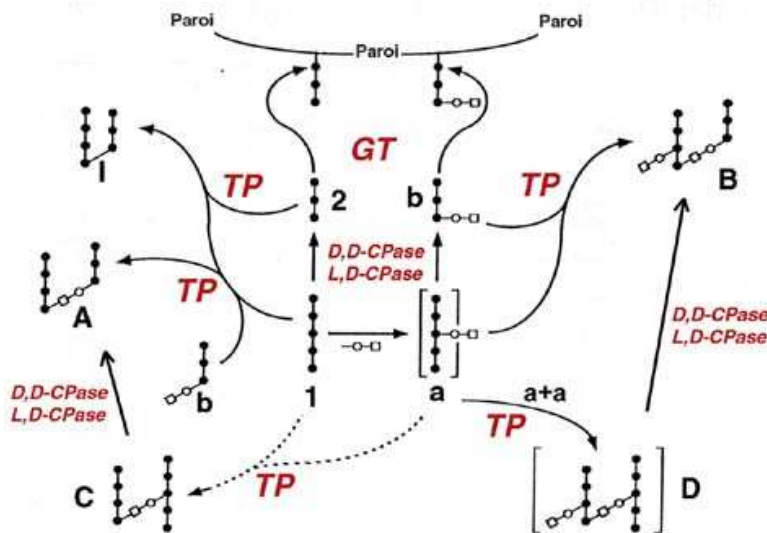


**Figure 15. Protocole de solubilisation spécifique du néo-peptidoglycane d'un pneumocoque.** Une souche de pneumocoque est cultivée en présence d'éthanolamine, transférée pendant une durée déterminée dans un milieu contenant de la choline et de la lysine marquée au tritium afin de distinguer les peptides nouvellement incorporés. Ensuite, soit le PG est extrait des parois cellulaires (protocole de droite), soit les cellules sont à nouveau transférées dans un milieu contenant de l'éthanolamine avant que le PG n'en soit extrait (protocole de gauche). La paroi ancienne contenant de l'éthanolamine et dépourvue de choline, est résistante à l'action hydrolytique de l'amidase [Mosser, 1970 #136]. Seules les portions de PG contenant de la choline seront digérées par l'amidase et pourront être analysées par chromatographie liquide à haute pression (HPLC). La détection par scintigraphie de la quantité de lysine radioactive incorporée dans les régions de néo-synthèse pariétale solubilisées spécifiquement permet d'étudier la composition du PG en fonction de son âge bio-synthétique (D'après Laitinen and Tomasz, 1990).

Les résultats ont montré que le PG nouvellement synthétisé contient une majorité de peptides monomériques (60% de l'ensemble des peptides du PG) dont la proportion diminue dans le PG plus ancien (40% de l'ensemble des peptides du PG). 90% de ces monomères sont des tripeptides linéaires ou branchés. La réduction du nombre de monomères s'accompagne d'une augmentation de la proportion de peptides dimériques de 30 à 50%. Ces dimères sont majoritairement des tri-térapeptides liés directement ou indirectement (peptides branchés). La proportion de trimères évolue peu (de 2 à 8%) au cours du vieillissement du PG (Laitinen et Tomasz, 1990).

La source du segment tripeptidique des dimères majoritaires (peptides I, A et B dans la Figure 16) est très certainement le monomère tripeptidique (peptides 2 et b dans la Figure 16) présent en grande quantité dans le néo-PG. Ces tripeptides sont déjà présents dans l'ancien PG mais proviendraient également d'une incorporation récente de monomères tripeptidiques ou pentapeptidiques. Ces derniers seraient alors rapidement transformés en tripeptides sous

l'action de D,D- puis de L,D-CPases (Laitinen et Tomasz, 1990). Le PG récent contient trop peu de monomères pentapeptidiques (4%, peptides 1 et a dans la Figure 16) pour que ces derniers constituent la source de tétrapeptides des dimères tri-tétrapeptidiques. Le matériel pentapeptidique serait donc fourni par le lipide II, précurseur du PG présent sur la surface externe de la membrane plasmique, ou par des chaînes polysaccharidiques précurseurs nouvellement polymérisées (Laitinen et Tomasz, 1990).



**Figure 16. Métabolisme hypothétique des peptides du peptidoglycane chez *S. pneumoniae*.** Les monomères linéaires sont identifiés par des chiffres arabes, les dimères connectés directement par des chiffres romains, les monomères branchés par des lettres minuscules et les dimères branchés par des lettres majuscules. Les cercles noirs représentent du haut vers le bas la séquence peptidique Ala-iGln-Lys pour un tripeptide, Ala-iGln-Lys-Ala pour un tétrapeptide et Ala-iGln-Lys-Ala-Ala pour un pentapeptide. Les cercles blancs représentent une sérine et les carrés blancs une alanine. GT : glycosyltransférase, TP : transpeptidase, CPase : carboxypeptidase. (D'après Laitinen and Tomasz, 1990 et Severin *et al.*, 1992).

Un premier mécanisme de synthèse du PG chez le pneumocoque consisterait donc à incorporer, par transglycosylation, des unités monomériques dans le PG pré-existant au cours d'une phase de « synthèse primaire », puis à réticuler le néo-PG au cours d'une phase de « maturation ». Un mécanisme alternatif est possible, il comprendrait une étape de polymérisation des précurseurs polysaccharidiques, puis une étape de transpeptidation qui permettrait d'insérer les chaînes polysaccharidiques précurseurs au PG pré-existant. Dans ces deux mécanismes, des transpeptidases utiliseraient des tripeptides accepteurs et des pentapeptides donneurs pour la réaction de transpeptidation, menant à la formation de dimères tri-tétrapeptidiques (Laitinen et Tomasz, 1990; Severin *et al.*, 1992).

L'un des premiers rôles physiologiques attribués aux D,D-CPases est de réaliser un contrôle négatif sur la réticulation du PG en clivant le dernier résidu D-Ala des pentapeptides donneurs. Les travaux décrits ci-dessus montrent qu'elles effectuent également un contrôle positif sur la réticulation de la muréine dans la mesure où elles sont essentielles à la génération de tripeptides accepteurs pour la réaction de transpeptidation. Cette hypothèse est

confortée par l'analyse de la composition des monomères et des dimères présent dans la paroi de la souche mutante *dacA*- de pneumocoque décrite précédemment (Schuster *et al.*, 1990). Dans ce mutant, la diminution considérable de monomères tripeptidiques (14% pour le type sauvage contre 1% pour le mutant) est accompagnée d'une accumulation de monomères pentapeptidiques (10% pour le type sauvage contre 36% pour le mutant) (Severin *et al.*, 1992). Le manque de mucopeptides accepteurs, les tripeptides monomériques, est certainement la cause indirecte des anomalies du processus de division du mutant (Schuster *et al.*, 1990; Severin *et al.*, 1992).

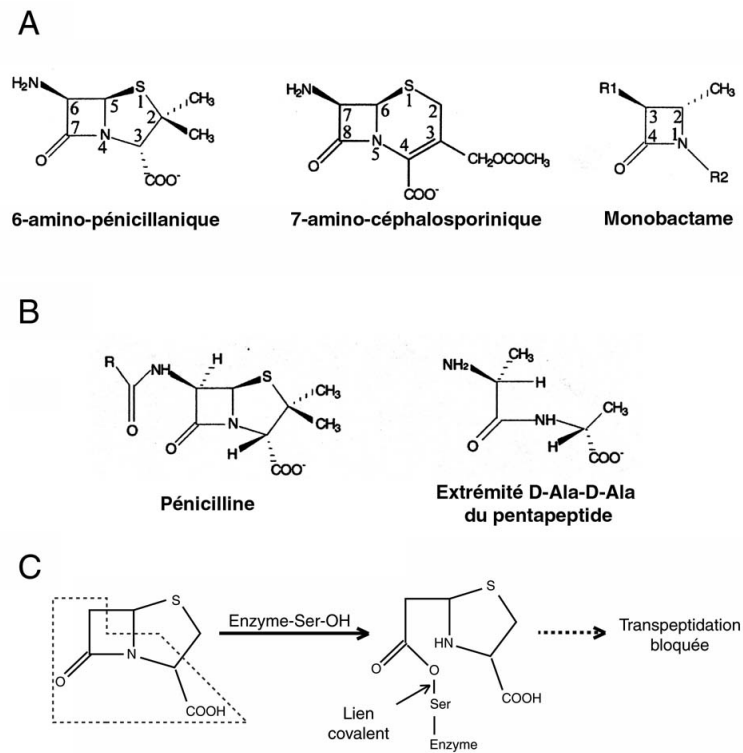
## ***INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DU PEPTIDOGLYCANE***

La haute conservation des voies de synthèse du PG ainsi que la présence exclusive du polymère chez les bactéries constituent un avantage certain pour le développement d'antibiotiques à large spectre peu toxiques pour les cellules eucaryotes.

### **I. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane**

#### **I.1. Les $\beta$ -lactamines**

La structure chimique de base des  $\beta$ -lactamines est un cycle  $\beta$ -lactame (amide cyclisée en  $\beta$ ) dont l'intégrité est essentielle à l'activité antibactérienne. Les trois catégories principales de  $\beta$ -lactamines résultent de la dérivation chimique de cette structure de base : association à un cycle thiazolidine pour le groupe des pénicillines qui possède de ce fait un noyau 6-amino-pénicillanique (6-APA), à un cycle dihydrothiazine pour le groupe des céphalosporines qui possède ainsi un noyau 7-amino-céphalosporinique (7-ACA) et substitution non-cyclique du monocycle  $\beta$ -lactame pour les monobactames (Figure 17A). Le noyau 7-ACA offre beaucoup plus de possibilités de substitutions que le noyau 6-APA (Figure 17A), il existe donc une plus grande variété de céphalosporines que de pénicillines.

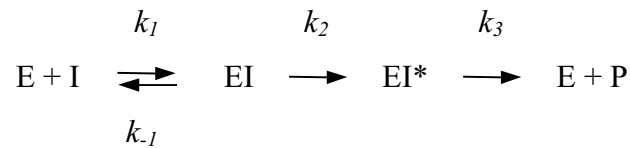


**Figure 17. Structure chimique des antibiotiques à cycle  $\beta$ -lactame.** A : Structure chimique des noyaux des trois principaux groupes de  $\beta$ -lactamines. B : Analogie structurale entre une pénicilline et un dipeptide D-alanyl-D-alanine. C : Blocage de la réaction de transpeptidation par un  $\beta$ -lactame dont l'analogie structurale avec la séquence D-Ala-D-Ala est illustrée en pointillés.

## I.2. Inhibition des activités transpeptidase et D,D-carboxypeptidase par les $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines sont des inhibiteurs des activités TP et D,D-CPase des PBP. La fonction amide du cycle  $\beta$ -lactame présente une analogie structurale avec la liaison peptidique du D-Ala-D-Ala qui est hydrolysée lors de l'acylation de la PBP (Figure 17B et 17C) (Tipper et Strominger, 1965). Le mécanisme d'interaction entre  $\beta$ -lactamines et PBP est appelé inhibition-suicide, l'enzyme elle-même catalysant la transformation de l'antibiotique en un composé hautement réactif auquel elle se lie de façon irréversible. Après reconnaissance de l'antibiotique (I) par une PBP (E), un premier complexe non covalent (EI\*) est formé entre les deux molécules. Au cours de la réaction d'acylation, l'enzyme se lie de façon covalente sur l'antibiotique, conduisant à la formation d'un complexe enzyme-antibiotique (EI) stable. L'antibiotique inactivé (P) est enfin libéré par la désacylation du complexe acyl-enzyme, réaction généralement très lente chez les PBP. Ce mécanisme peut être représenté par l'équation suivante dans laquelle  $K = k_{-1}/k_1$  correspond à la constante de dissociation du

complexe non covalent et  $k_2$  et  $k_3$  aux constantes de vitesse d'acylation et de désacylation (Adam *et al.*, 1997; Frere *et al.*, 1975; Fuad *et al.*, 1976; Jamin *et al.*, 1993) :



La conséquence la plus recherchée de l'action des  $\beta$ -lactamines est la lyse des cellules (bactériolyse). Cependant, ces antibiotiques peuvent n'entraîner qu'une diminution de la viabilité ou une inhibition réversible de la croissance de certaines espèces bactériennes (bactéries  $\beta$ -lactame-tolérantes). Par ailleurs, les diverses  $\beta$ -lactamines peuvent causer des effets biochimiques, morphologiques, et antibactériens tout à fait différents chez une même espèce bactérienne. Il y aurait donc vraisemblablement plus d'un mécanisme à l'origine du phénomène de bactériolyse inhérent à l'exposition aux  $\beta$ -lactamines. La conséquence majeure de l'inactivation des PBPs par les  $\beta$ -lactamines est l'arrêt de la réticulation du PG. Alexander Tomasz propose que chez *S. pneumoniae*, l'interférence des  $\beta$ -lactamines avec la synthèse de la paroi lèverait un contrôle négatif exercé par la cellule sur l'activité autolytique des hydrolases du PG (Tomasz, 1979). De manière générale, il est très probable que l'effet bactéricide des  $\beta$ -lactamines résulte d'un mécanisme indirect, basé sur la rupture de l'équilibre entre les activités de synthèse, de dégradation et de recyclage nécessaire à la réorganisation structurale du PG en cours de croissance (Leduc *et al.*, 1985; Tomasz, 1979).

### I.3. Inhibition de la réaction de transglycosylation par les glycopeptides et les moénomycines

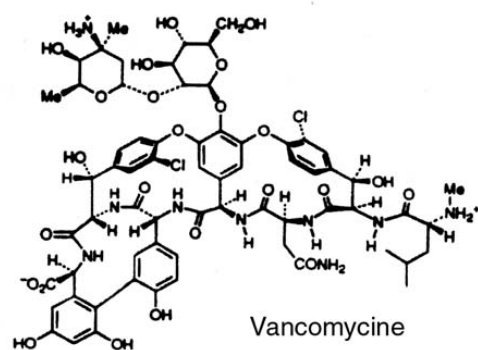
Bien que la transglycosylation soit essentielle à la synthèse de la paroi et constitue par conséquent une cible antibactérienne de choix, il existe peu d'antibiotiques inhibant cette réaction. Les plus utilisés appartiennent aux familles des glycopeptides et des moénomycines et agissent préférentiellement sur les bactéries Gram<sup>+</sup> (Goldman et Gange, 2000). Parmi les premiers, la vancomycine (Figure 18A), produite par *Amycolatopsis orientalis*, se fixe sur le motif D-Ala-D-Ala des chaînes peptidiques qui n'est alors plus reconnu par les PBPs (Perkins, 1969), entraînant une inhibition indirecte des activités TP et GT. Cet antibiotique est souvent utilisé en dernier ressort dans le cas d'infections multi-résistantes aux  $\beta$ -lactamines, mais l'émergence de souches d'entérocoques et de staphylocoques résistants à la vancomycine nécessite déjà la révision des stratégies thérapeutiques relatives à l'utilisation



de glycopeptides (dérivés de glycopeptides ou antibiotiques non-glycopeptides) (Boger, 2001; Boneca et Chiosis, 2003).

Les moénomyces (Figure 18B), produites par différentes espèces de *Streptomyces*, sont des phosphoglycolipides interférant avec la synthèse du PG (Di Guilmi *et al.*, 2002; Huber et Nesemann, 1968; van Heijenoort *et al.*, 1987). Chez le pneumocoque, la capacité de la moénomyces A à se lier spécifiquement au domaine GT des PBP de classe A a été montrée pour PBP1a, PBP1b et PBP2a (Di Guilmi *et al.*, 2003; Di Guilmi *et al.*, 2003; Di Guilmi *et al.*, 1998). Malgré la capacité de la moénomyces à inhiber la réaction de transglycosylation (Di Guilmi *et al.*, 2003; Ishino *et al.*, 1980; Schiffer et Holtje, 1999; Schwartz *et al.*, 2001), ses effets toxiques secondaires empêchent son utilisation clinique. La structure tridimensionnelle d'une PBP bi-fonctionnelle complexée à la moénomyces est nécessaire à la conception de dérivés non toxiques ou de nouveaux inhibiteurs de l'activité GT.

A



B

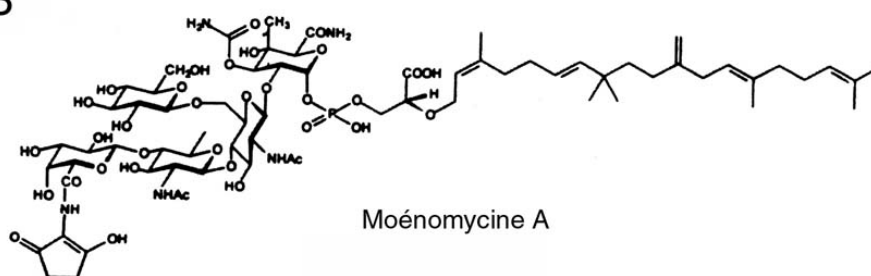


Figure 18. Structure chimique des antibiotiques qui interfèrent avec la réaction de transglycosylation, vancomycine (A) et moénomyces A (B).

## II. La résistance aux $\beta$ -lactamines chez *Streptococcus pneumoniae*

Il existe trois mécanismes principaux de résistance bactérienne aux  $\beta$ -lactamines (Dessen *et al.*, 2001; Saves et Masson, 1998; Walsh, 2000). Le plus courant repose sur une production de  $\beta$ -lactamases qui inactivent l'antibiotique par hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame avant que ce dernier n'ait pu atteindre sa cible (Helfand et Bonomo, 2003). Le deuxième mécanisme concerne uniquement les bactéries Gram- chez lesquelles la résistance peut provenir d'une diminution de la perméabilité de la membrane externe. Enfin, la résistance peut provenir de l'acquisition de nouvelles PBPs présentant une sensibilité réduite aux  $\beta$ -lactamines ou d'une modification de la structure primaire des PBPs de haute masse moléculaire, entraînant une baisse d'affinité pour ces mêmes antibiotiques. Seul ce dernier mécanisme, à la base de la résistance du pneumocoque aux  $\beta$ -lactamines, sera détaillé dans le chapitre suivant.

### II.1. La modification des PBPs à la base de la résistance chez le pneumocoque

L'affinité d'une PBP pour un antibiotique est propre à chaque enzyme. Face à une forte pression de sélection exercée par un traitement antibiotique donné, les premières PBPs à être modifiées seront les PBPs essentielles à la survie bactérienne qui présentent une forte affinité pour cet antibiotique.

La résistance aux  $\beta$ -lactamines s'est développée dans un premier temps via l'apparition de mutations ponctuelles dans les gènes codant pour les PBPs de haute masse moléculaire puis par transfert horizontal de matériel génétique entre différentes espèces de streptocoques. *S. pneumoniae*, par exemple, acquiert un haut niveau de résistance par transfert horizontal de gènes en provenance d'autres espèces de streptocoques tels que *S. mitis* ou *S. oralis*. En effet, cette bactérie possède une compétence naturelle qui lui permet d'acquérir du matériel génétique étranger et de l'intégrer à son propre génome par recombinaison génétique (Havarstein *et al.*, 1997).

Chez des souches de pneumocoque résistantes isolées en milieu hospitalier, certains gènes codant pour des PBPs de haute masse moléculaire montrent une séquence nucléotidique mosaïque : des régions de séquence nucléotidique identiques à celles de gènes issus de pneumocoques sensibles aux  $\beta$ -lactamines et des régions présentant de nombreuses mutations et provenant d'espèces de streptocoques différentes se retrouvent sur un même gène dit

mosaïque (Coffey *et al.*, 1993; Dowson *et al.*, 1993; Dowson *et al.*, 1989; Dowson *et al.*, 1989; Dowson *et al.*, 1990; Laible *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1992; Sibold *et al.*, 1994; Spratt, 1994). Les gènes mosaïques qui en résultent codent pour des PBPs d'affinité réduite pour les  $\beta$ -lactamines. Si déjà quelques travaux ont permis d'identifier une demi-douzaine de mutations véritablement impliquées dans la perte d'affinité des PBPs pour les  $\beta$ -lactamines (Chesnel *et al.*, 2003; Mouz *et al.*, 1999; Mouz *et al.*, 1998), un important travail de discrimination entre toutes les mutations portées par les gènes mosaïques reste encore à faire.

## **II.2. Structure du peptidoglycane de souches de pneumocoque résistantes aux $\beta$ -lactamines**

Il semblerait que l'acquisition de la résistance par modification de la structure primaire des enzymes cibles provoque un remodelage de la structure de la paroi cellulaire. En effet, une modification de la structure du PG a été observée chez des souches de *S. pneumoniae* résistantes aux  $\beta$ -lactamines. Chez un pneumocoque sensible, les muuropeptides majoritaires sont des chaînes peptidiques linéaires alors que des chaînes « branchées », dont le groupe  $\epsilon$ -aminé porté par la lysine est substitué par des dipeptides Ala-Ala ou Ser-Ala, sont majoritaires chez un pneumocoque résistant aux  $\beta$ -lactamines (Garcia-Bustos et Tomasz, 1990). Deux enzymes, MurM et MurN catalysent respectivement l'addition du premier (Ser ou Ala) et du deuxième (Ala) résidu « branché » (Filipe *et al.*, 2000; Filipe et Tomasz, 2000).

Il est très probable que la modification des PBPs, à l'origine de la diminution de leur affinité pour les  $\beta$ -lactamines, entraîne également une diminution de leur réactivité envers leurs substrats naturels, les précurseurs disaccharidiques linéaires. En effet, les déterminants moléculaires de la résistance identifiés à ce jour sont tous localisés près du site de liaison aux antibiotiques (Chesnel *et al.*, 2003; Dowson *et al.*, 1989; Hakenbeck *et al.*, 1986; Mouz *et al.*, 1999; Mouz *et al.*, 1998) et devraient entraîner des modifications structurales de la cavité enzymatique. Ainsi, la structure tridimensionnelle de la PBP2x issue de la souche de pneumocoque Sp328, résistante aux  $\beta$ -lactamines et isolée en milieu clinique, possède un site actif plus « ouvert » que celui d'une PBP2x issue d'une souche de pneumocoque sensible (Dessen *et al.*, 2001). De telles modifications peuvent expliquer pourquoi les PBPs issues des souches résistantes auraient davantage de facilité à utiliser les peptides branchés pour synthétiser le PG (Garcia-Bustos et Tomasz, 1990).

## CROISSANCE ET DIVISION BACTERIENNE : UNE QUESTION DE COMPLEXES ?

Aucune rupture dans le maillage du PG ne doit apparaître au cours de la croissance et de la division cellulaire. Une régulation et un couplage des activités synthétiques et lytiques inhérentes à la synthèse du PG s'imposent donc, d'où l'hypothèse de complexes multienzymatiques associées à la synthèse pariétale. Il est très probable que le mode d'insertion de nouvelles unités de PG diffère entre l'élongation et la septation de la bactérie. Il existerait donc logiquement deux complexes de composition différente : un complexe d'élongation et un complexe de septation.

Le concept d'un complexe de septation peut être étendu à celui, plus global, d'un complexe de division. En effet, la division nécessite, en plus de la synthèse du PG, diverses autres activités (constriction de la membrane cytoplasmique, ségrégation des chromosomes, ...) qui pourraient être logiquement coordonnées au sein d'un complexe multienzymatique. Reflétant cette nécessité de coordination, de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans la synthèse du PG et la division cellulaire sont rassemblés au sein d'un groupe de gènes nommé *dcw* (division and cell wall) (Ayala *et al.*, 1994; Vicente et Errington, 1996).

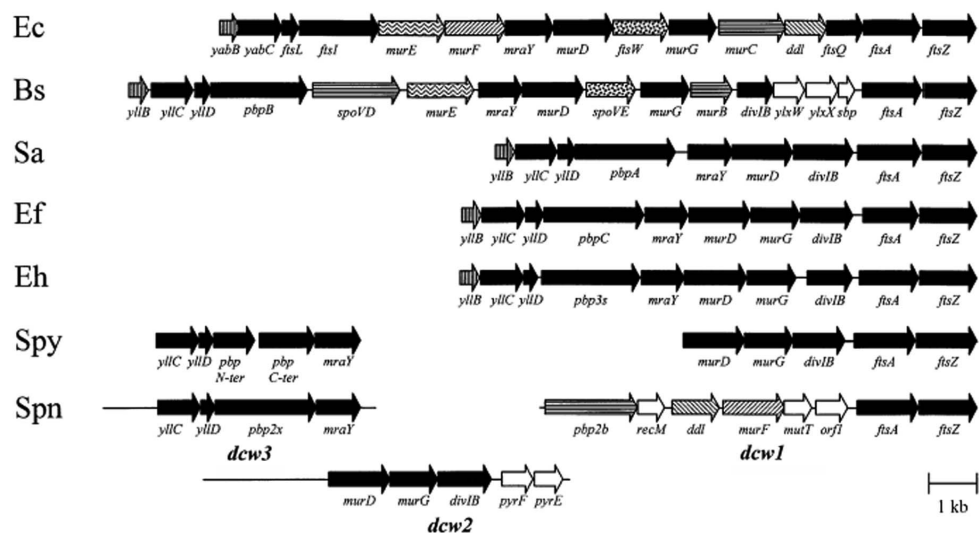


Figure 19. Comparaison des groupes de gène *dcw* d'*E. coli* (Ec), *B. subtilis* (Bs), *S. aureus* (Sa), *Enterococcus faecalis* (Ef), *E. hirae* (Eh), *S. pyogenes* (Spy) et *S. pneumoniae* (Spn). Les régions codantes et leur sens de transcription sont indiqués par des flèches, le nom des gènes est indiqué sous les régions codantes correspondantes. Les gènes *dcw* communs à toutes les espèces, excepté *murG* qui est absent chez *S. aureus*, sont colorés en noir ; ceux présents chez au moins deux espèces sont indiqués par divers motifs, les homologues structuraux ou fonctionnels sont montrés avec le même motif. Les gènes *dcw* présents dans une seule espèce sont hachurés horizontalement, les opérons non liés aux gènes *dcw* sont en blanc. (D'après Massida *et al.*, 1998)

L'organisation de ce groupe de gènes diffère en fonction des genres et des espèces bactériennes (Figure 19), celui de *S. pneumoniae* notamment, partagé en trois régions sur son chromosome, possède une organisation particulièrement atypique (Massidda *et al.*, 1998). Malgré ces différences, le groupe de gènes *dcw* est présent dans de nombreuses espèces bactériennes. Il reflète une nécessité de régulation stricte des processus de synthèse de la paroi et de division cellulaire et sa conservation va dans le sens de l'existence de complexes multienzymatiques associés à ces mêmes processus.

L'un des objectifs majeurs des recherches menées sur la croissance et la division bactérienne des quarante dernières années a donc été de mettre en évidence l'existence de tels complexes, et le cas échéant d'en déterminer la composition.

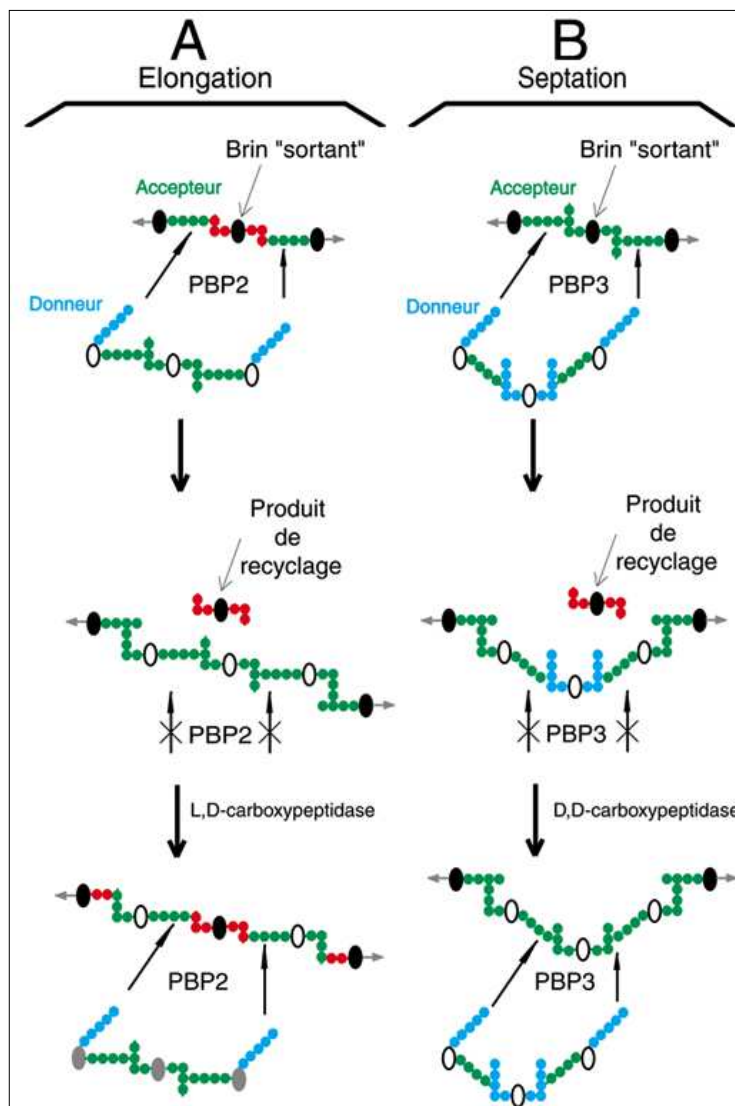
## **I. Synthèse du peptidoglycane et complexes multienzymatiques associés**

### **I.1. Le modèle « Trois pour un »**

Le modèle « trois pour un » de synthèse du PG pour l'élongation et la septation chez *E. coli* a été proposé par Høltje en 1993 (Holtje, 1993). Au cours de l'élongation, trois chaînes polysaccharidiques interconnectées par des dimères tétra-térapeptidiques seraient fixées par transpeptidation sur les amines libres de dimères tri-térapeptidiques présents de part et d'autre d'une chaîne du PG pré-existant, appelée le brin « sortant ». Cette étape générerait des trimères peptidiques dont le clivage spécifique par des hydrolases permettrait de libérer le brin « sortant » (Figure 20A) (Holtje, 1993). Si, de manière diffuse et sur toute la partie cylindrique d'un bacille, 50% des chaînes pré-existantes sont substituées par un triplet polysaccharidique, alors la quantité de PG ainsi que la taille de la cellule doublent. Ceci n'est valable que si les chaînes polysaccharidiques sont orientées parallèlement à la membrane cytoplasmique et si le recyclage des brins de PG nouvellement insérés est bloqué jusqu'à la division de la cellule. Les différences observées dans la composition du nouveau et de l'ancien PG (Glauner et Holtje, 1990) pourraient être à l'origine d'une telle régulation du processus d'élongation : seuls les dimères tri-térapeptidiques des chaînes « anciennes » pourraient accepter de nouveaux triplets polysaccharidiques. L'insertion de triplets menant à une réticulation tétra-tétra du néo-PG, la réinitiation d'un cycle d'élongation nécessiterait

l'intervention d'une L,D-CPase qui transformerait ces dimères tétra-térapeptidiques en dimères tri-térapeptidiques (de Pedro et Schwarz, 1981; Glauner et Holtje, 1990).

Höltje propose un modèle similaire pour la septation, à la différence que tous les triplets doivent être insérés au niveau du même site, le site de septation, et que le brin central de chaque triplet nouvellement inséré doit accepter le triplet suivant (Holtje, 1993) (Figure 20B). A l'issue de la phase d'élongation, le PG septal possède une majorité de dimères tétra-térapeptidiques (de Jonge *et al.*, 1989). Dans le cadre du modèle « Trois pour un », ces tétra-térapeptides seraient nécessaires à l'insertion septale de triplets polysaccharidiques. Ces derniers portant des dimères penta-térapeptidiques, les triplets nouvellement insérés devraient rapidement être transformés en tétra-térapeptides par une D,D-CPase de manière à autoriser l'insertion de nouveaux triplets (de Pedro et Schwarz, 1981; Glauner et Holtje, 1990).



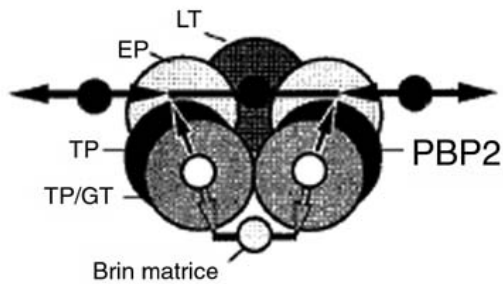
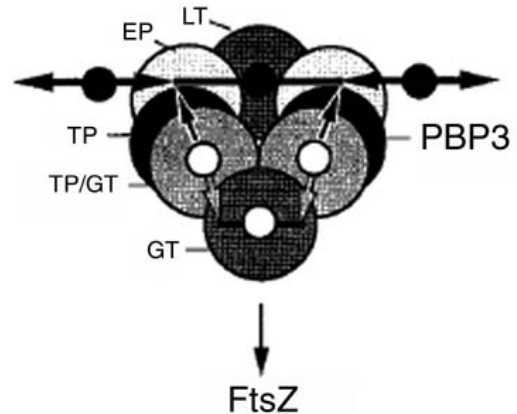
**Figure 20. Elongation et septation chez *E. coli* selon le modèle « Trois pour un ».** Un triplet de chaînes polysaccharidiques est attaché par transpeptidation sur une chaîne de la couche de PG existante. Le clivage du trimère qui en résulte permet de libérer le brin de PG « sortant » et d'incorporer les trois nouvelles chaînes. A : Modèle « Trois pour un » pour l'élongation au cours de laquelle la proportion de dimères tri-térapeptidiques diminue et celle de dimères tétra-térapeptidiques, portés par les triplets insérés, augmente. L'intervention d'une L,D-CPase sera nécessaire à la réinitialisation d'un cycle d'élongation. B : Modèle « Trois pour un » pour la septation au cours de laquelle la proportion de dimères tétra-térapeptidiques diminue et celle de dimères penta-térapeptidiques, portés par les triplets insérés, augmente. L'intervention d'une D,D-CPase après chaque nouvelle insertion de triplet permet d'insérer le triplet suivant (Adapté de Höltje, 1993, 1998).

Le modèle « Trois pour un », tient compte de nombreuses données relatives à la croissance et la division d'*E. coli* (composition du PG en fonction de son âge bio-synthétique, présence de produits de recyclage, élongation diffuse, doublement en taille avant la division) et s'avère compatible avec la croissance de la mono-couche de PG d'un bacille Gram-. Toutefois, quelques bases de ce modèle, telles que la teneur majoritaire du PG septal en tétra-tétrapeptidiques (de Jonge *et al.*, 1989) ou l'utilisation de tétrapeptides comme accepteurs de la réaction de transpeptidation catalysée par PBP3 sont mises en cause par d'autres travaux. En effet, il a été rapporté que le PG septal contiendrait une majorité de tripeptides et que ces derniers seraient préférentiellement utilisés par PBP3 comme accepteurs de la réaction de transpeptidation (Beck et Park, 1976; Begg *et al.*, 1990; de Pedro et Schwarz, 1981; Mirelman *et al.*, 1978; Pisabarro *et al.*, 1986).

Par ailleurs, le modèle « Trois pour un » s'applique difficilement à des bactéries chez lesquelles la synthèse de PG au cours de la croissance n'est pas diffuse mais localisée, comme dans le cas des coques. Il est également peu adapté aux bactéries Gram+ pour lesquelles il s'agit de synthétiser non pas une mais une vingtaine de couches de PG (Beveridge, 1981). Ce modèle semble particulièrement peu applicable à la synthèse de la paroi de *S. pneumoniae* qui est un coque Gram+ et qui ne semble posséder aucune activité de recyclage de la muréine (Williamson *et al.*, 1980).

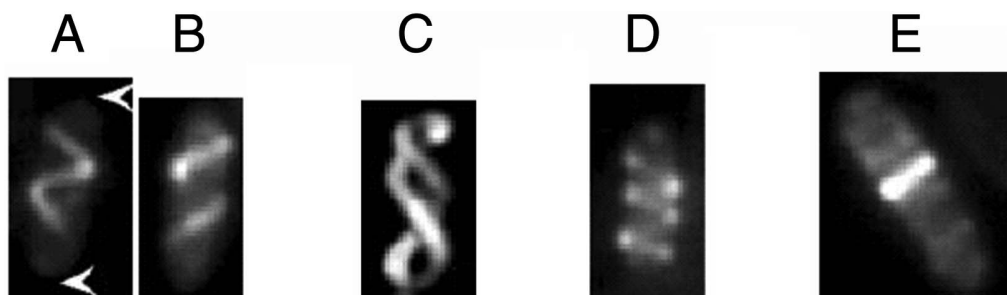
## **I.2. Complexes multienzymatiques de synthèse du peptidoglycane**

La forte pression osmotique des bactéries exige que l'intégrité du PG ne soit pas altérée lors de sa synthèse, sous peine de lyse de la cellule. Ceci implique que l'activité lytique intervenant au cours du remodelage du polymère soit finement régulée et couplée à l'activité de synthèse. Ces exigences sont en faveur de l'existence de complexes multienzymatiques incluant toutes les activités nécessaires à la dynamique du PG (Holtje, 1998; Holtje, 1996a; Holtje, 1996b). Sur la base du modèle « Trois pour un » et à l'appui de données expérimentales *in vitro* en faveur d'interactions entre des transglycosylases et des PBPs chez *E. coli* (Romeis et Holtje, 1994; von Rechenberg *et al.*, 1996), Holtje a proposé un modèle dans lequel l'élongation et la septation seraient réalisées au sein de deux complexes multienzymatiques spécifiques à chacun des deux processus (Holtje, 1996a; Holtje, 1996b) (Figure 21).

**Complexe hypothétique d'élongation****Complexe hypothétique de septation**

**Figure 21. Complexes hypothétiques de synthèse du peptidoglycane.** L'insertion de néo-PG serait réalisée par deux complexes multi-enzymatiques hypothétiques dont la spécificité résiderait dans la présence de la transpeptidase PBP2 (élongation) ou PBP3 (septation). Au sein du complexe d'élongation, un dimère de PBP bifonctionnelles synthétiserait le triplet polysaccharidique à partir d'un brin matrice. Au cours de la septation, les trois brins du triplet sont synthétisés simultanément, une glycosyltransférase catalysant la synthèse du brin équivalent au brin matrice de l'élongation. Au sein des deux complexes, l'insertion du triplet serait ensuite réalisée par les dimères de transpeptidase, d'endopeptidase et par la transglycosylase lytique. Les grands cercles représentent les enzymes, les petits cercles pleins représentent les chaînes polysaccharidiques existantes et les cercles vides représentent les chaînes néo-synthétisées. Les flèches et les traits représentent respectivement les peptides donneurs et accepteurs (D'après Höltje, 1998).

FtsZ, qui forme un anneau cytoplasmique au site de division, serait impliquée dans le recrutement des composants du complexe de septation. Les composants du complexe d'élongation chez les bacilles pourraient être recrutés par MreB, protéine impliquée dans le maintien de la morphologie cellulaire (Den Blaauwen *et al.*, 2003). En effet, chez *B. subtilis* et *E. coli*, cet homologue de l'actine eucaryote adopte une structure hélicoïdale, identique à celle observée pour le néo-PG chez *B. subtilis* (Figures 10B et 22). La protéine se localise par ailleurs au milieu de la cellule au cours de la division (Jones *et al.*, 2001; Shih *et al.*, 2003; van den Ent *et al.*, 2001).



**Figure 22. Localisation cellulaire de YFP-MreB chez *E. coli*.** A, B, D et E : Visualisation directe par microscopie à fluorescence de la protéine MreB fusionnée à la YFP (yellow fluorescent protein). C : Reconstruction tri-dimensionnelle d'une série d'images prises dans des plans différents et déconvoluées. YFP-MreB adopte une structure hélicoïdale relâchée (A, B et C) ou compressée (D), elle se localise également au site de division dans certaines cellules (E). (D'après Shih *et al.*, 2003).



Au sein des modèles de complexes multienzymatiques proposés par Höltje, un dimère de PBPs bi-fonctionnelles catalyserait d'abord l'assemblage du triplet polysaccharidique, un homodimère de TP le grefferait ensuite sur le PG pré-existant, et un dimère d'endopeptidases libèrerait le brin « sortant » dont la dépolymérisation serait finalement catalysée par une transglycosylase lytique (Figure 21) (Holtje, 1996a). Chez la grande majorité des bactéries, la classe B des PBPs de haute masse moléculaire compte deux représentants TP, l'un étant impliqué dans le processus d'élongation et l'autre dans le processus de septation. D'après Höltje, la différence entre les complexes d'élongation et de septation reposerait donc sur la nature de l'homodimère de TP (Holtje, 1996b).

Nous avons vu dans le paragraphe IV.1 que chez *E. coli*, PBP3 participe exclusivement à la septation mais que PBP2 est impliquée dans les deux processus d'élongation et de septation (Den Blaauwen *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 1998). En ce qui concerne *E. coli*, une nuance découlant de cette donnée doit donc être apportée au modèle décrit ci-dessus : si les complexes proposés par Höltje existent, leur spécificité résiderait non pas sur la nature de l'homodimère de TP, puisque les deux TP PBP2 et PBP3 seraient présentes dans le complexe de septation, mais sur la présence ou l'absence de la TP exclusivement impliquée dans la septation, FtsI (PBP3 chez *E. coli*).

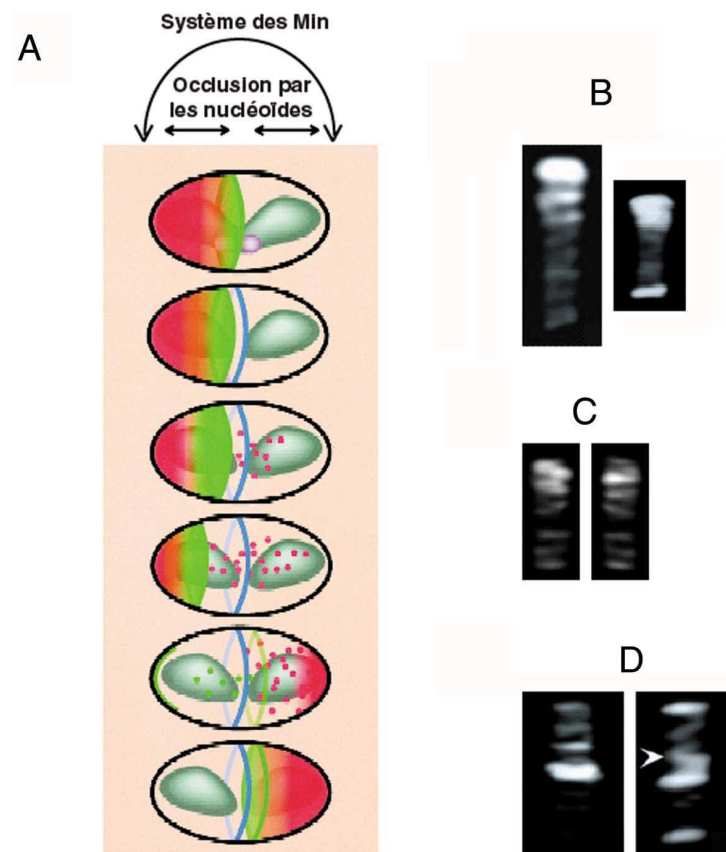
La synthèse du PG requiert une activité GT, cette donnée est intégrée dans le modèle de Höltje avec la présence d'un dimère de PBPs bi-fonctionnelles. Deux des PBPs bi-fonctionnelles d'*E. coli*, PBP1a et PBP1b, forment des homodimères stables qui pourraient synthétiser les triplets de polysaccharides dans le cadre du modèle « Trois pour un » (Chalut *et al.*, 1999; Charpentier *et al.*, 2002; Zijderveld *et al.*, 1991; Zijderveld *et al.*, 1995). Dans le cadre des modèles proposés par Höltje, l'homodimère de PBP1a participerait au complexe de septation et celui de PBP1b au complexe d'élongation (Charpentier *et al.*, 2002).

Les seules interactions physiques entre enzymes synthétiques et hydrolytiques ont été démontrées pour des transglycosylases lytiques et des PBPs d'*E. coli* (Romeis et Holtje, 1994; Vollmer *et al.*, 1999; von Rechenberg *et al.*, 1996). Romeis et von Rechenberg ont greffé sur une résine les transglycosylases lytiques Slt70 et MltB. Les colonnes ont retenu les PBPs bi-fonctionnelles PBP1a, 1b et 1c, les transpeptidases PBP3 et PBP2 et les endopeptidases PBP4 et PBP7 (Romeis et Holtje, 1994; von Rechenberg *et al.*, 1996). Vollmer a montré quant à lui qu'une résine sur laquelle est fixée la transglycosylase lytique MltA retenait les PBPs 1b, 1c, 2 et 3, ainsi que quelques autres protéines non PBPs (Vollmer *et al.*, 1999). L'une d'entre elles, la protéine structurale MipA (MltA interacting protein) s'est révélée interagir spécifiquement avec PBP1b et MltA au sein d'un complexe trimérique

(Vollmer *et al.*, 1999). Bien qu'il manque à ce complexe l'activité d'une PBP mono-fonctionnelle (TP), son identification constitue une première étape vers la reconstitution d'un complexe théorique responsable de la synthèse du PG.

## II. Acteurs protéiques de la division cellulaire

La plupart des études menées sur le processus de division cellulaire ont concerné *E. coli*. C'est pourquoi cette bactérie a été choisie comme modèle de la division bactérienne dans les paragraphes suivants.



**Figure 23. Détermination du site de division chez *E. coli*.** A : Représentation schématique de la dynamique cellulaire du système Min. Dans une cellule prête à se diviser, les nucléoïdes (en gris) bloquent la division dans leur proche voisinage, l'anneau Z (en bleu) ne peut plus s'assembler qu'aux pôles ou dans la région centrale de la cellule. MinCD (en rouge, le dégradé symbolise le gradient de concentration en molécules) est un inhibiteur de la polymérisation de FtsZ et s'associe à la membrane cytoplasmique à l'un des deux pôles de la cellule. L'oscillation de l'anneau de MinE (en vert) provoque la dissociation membranaire de MinCD qui migre alors au pôle opposé de la cellule pour s'associer de nouveau à la membrane. L'anneau Z ne peut se stabiliser qu'au site de division qui n'est pas balayé par le complexe MinCD. B-D : Microscopie à fluorescence, reconstruction tridimensionnelle d'une série d'images prises dans des plans différents et déconvoluées. B : Localisation cellulaire de MinD fusionnée à la GFP (green fluorescent protein, image de gauche) et de YFP-MinD (image de droite). C : GFP-MinC. Les deux images proviennent d'une même cellule observée sous deux angles différents (rotation de 180° autour de son axe longitudinal). D : GFP-MinE. (D'après RayChaudhuri *et al.*, 2001 et Shih *et al.*, 2003)

## II.1. Positionnement du site de division

Le système d'occlusion par les chromosomes est un premier type de régulation du positionnement du site de division (Figure 23A) mais ce système reste controversé. La dernière et la plus probable des hypothèses proposées serait que la polymérisation de l'anneau de FtsZ s'effectue préférentiellement dans des zones possédant une faible concentration d'ADN (Harry, 2001).

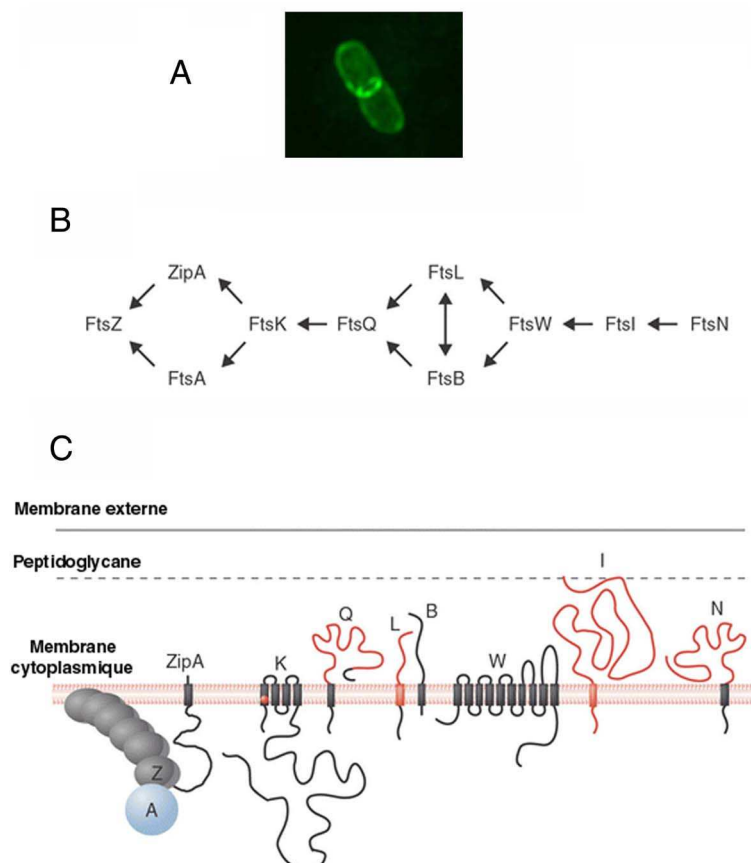
Chez *E. coli*, une seconde forme de régulation de la division est exercée par le système Min (Figure 23A). L'oscillation d'un pôle à l'autre de la cellule des trois composantes du système, MinC, MinD et MinE, permettrait le positionnement correct de l'anneau Z au centre de la cellule (Harry, 2001; Margolin, 2001). MinC est un dimère inhibant la polymérisation de FtsZ (Hu *et al.*, 1999), il interagit avec MinD, qui est une ATPase liée à la membrane (de Boer *et al.*, 1991), pour former le complexe MinCD, régulateur négatif de l'assemblage de l'anneau Z (de Boer *et al.*, 1992; Hu et Lutkenhaus, 2000). MinE est un dimère qui formerait une structure annulaire oscillant alternativement d'une position proche du site de division à l'un des deux pôles de la cellule (Figure 23A) (Fu *et al.*, 2001; Hale *et al.*, 2001). Le déplacement de MinE est accompagné du départ du complexe MinCD qui se ré-assemble alors au pôle opposé de la cellule, l'oscillation de MinCD qui en résulte provoque la dissociation des polymères de FtsZ. Le complexe MinCD balaye ainsi toute la surface de la membrane cytoplasmique exceptée la zone avoisinant le site de division, au niveau de laquelle FtsZ pourra polymériser pour former un anneau stable (Harry, 2001; Margolin, 2001). Le mécanisme d'interaction entre MinE et MinCD est encore mal connu. Récemment, des expériences de marquage fluorescent de MinC, MinD et MinE ont généré des images à haute résolution qui ont montré une organisation hélicoïdale de ces protéines (Figure 23B-D) (Shih *et al.*, 2003). Une telle structure jouerait un rôle important dans la dynamique du système Min.

L'occlusion par les nucléoïdes et le système Min fonctionnent de manière indépendante mais le rôle joué par les chromosomes sur le positionnement de l'anneau Z semble relativement redondant en comparaison des restrictions imposées par le système Min (Corbin *et al.*, 2002; Sun et Margolin, 2001; Sun *et al.*, 1998). Toutefois, le système Min n'existe pas chez toutes les espèces bactériennes, en particulier chez les coques Gram+ (Margolin, 2001), et le rôle du chromosome pourrait dans leur cas être essentiel. Chez *B. subtilis* dépourvu de MinE, une autre protéine, DivIVA, participerait au positionnement du complexe inhibiteur MinCD, soit en recrutant MinCD aux pôles de la cellule, soit en

empêchant MinCD de se localiser au site de division du bacille (Edwards et Errington, 1997; Marston *et al.*, 1998). *S. pneumoniae* quant à lui ne semble posséder aucun des trois composants du système Min, en revanche, il posséderait plusieurs homologues de DivIVA.

## II.2. Recrutement des protéines Fts au site de division

La réplication du chromosome et le positionnement du site de division constituent des étapes préliminaires à la division bactérienne. Une fois engagée, cette dernière requiert non seulement la synthèse de PG septal mais également divers autres processus tels que la ségrégation des chromosomes ou la constriction de la membrane cytoplasmique. La coordination de ces différents phénomènes apparaît indispensable, c'est pourquoi l'existence d'un complexe macromoléculaire couplant les activités inhérentes à la division bactérienne est couramment suggéré. A ce jour, ce complexe potentiel, nommé « divisome », n'a jamais été identifié, l'argument principal en faveur de son existence provient de la localisation au site de division d'un grand nombre de protéines impliquées dans la division cellulaire. Les indices de l'existence du divisome sont pour la plupart indirectes, très peu d'interactions entre ses composants potentiels ayant été démontrées de manière directe.



Les travaux menés au cours des dix dernières années étaient basés essentiellement sur des techniques de microscopie à fluorescence (Figure 24A) couplées à de la génétique. Ils ont montré le recrutement conditionnel d'un groupe conservé de protéines Fts au site division de la bactérie. L'ordre et la dépendance de cet assemblage ont été entièrement décrits chez *E. coli* (Figure 24B et 24C) et dans une moindre mesure chez *B. subtilis* (Buddelmeijer et Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003). Le terme de Fts pour « Filamentous temperature sensitive » provient de la morphologie filamenteuse, symptomatique d'un arrêt de la division mais pas de la croissance cellulaire, adoptée par des mutants thermosensibles de ces protéines cultivés à température non permissive. En dépit des efforts déployés pour élucider le mécanisme de la division bactérienne, la fonction biologique des Fts n'a pas été identifiée, excepté pour deux d'entre elles : FtsZ qui constitue la « locomotive » du processus d'invagination de la membrane cytoplasmique (Addinall et Holland, 2002), et FtsI, PBP de classe B impliquée dans la synthèse de PG septal (Wang *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 1997).

### II.2.1. FtsZ

FtsZ est une protéine cytoplasmique essentielle (Dai et Lutkenhaus, 1991), présente chez quasiment toutes les bactéries et dans de nombreux organelles eucaryotes (Margolin, 2000). Elle est au sommet de la hiérarchie d'assemblage des Fts au site de division et représente de ce fait un composant clé de la division bactérienne. FtsZ a la capacité de polymériser pour former un anneau au site de division de la cellule (Bi et Lutkenhaus, 1991). La formation de l'anneau Z est la résultante d'un assemblage de protofilaments de FtsZ (Bramhill et Thompson, 1994; Erickson *et al.*, 1996), elle dépend par ailleurs de la présence de GTP qui est hydrolysé par l'activité GTPase de la protéine au cours de sa polymérisation (de Boer *et al.*, 1992; Mukherjee et Lutkenhaus, 1994). Le mécanisme de polymérisation de FtsZ est donc très proche de celui de son homologue structural, la tubuline. La quantité de FtsZ, toujours constante (Aldea *et al.*, 1990), a été estimée à 15 000 molécules par cellule, ce qui autoriserait la formation de 15-20 anneaux (Lu *et al.*, 1998). La totalité des protéines ne sont cependant pas déployées au site de division puisque seulement 30% des protéines y sont présentes (Stricker *et al.*, 2002). En fait, un échange constant s'effectue entre les protéines présentes dans le cytoplasme et celles polymérisées au niveau du site de division, ce qui fait

de l'anneau Z une structure très dynamique qui se dé-assemble en 1 minute et se ré-assemble en moins de trois minutes (Stricker *et al.*, 2002).

Basés sur le fait qu'un anneau Z disjoint n'empêche pas la constriction de la membrane (Addinall et Lutkenhaus, 1996), deux modèles non exclusifs expliquant le mécanisme de constriction de l'anneau Z ont été proposés par Brahmill. Dans le premier, une protéine motrice permettrait le recouvrement progressif de protofilaments de FtsZ et dans le deuxième, la constriction de l'anneau serait médiée par la perte progressive de molécules de FtsZ au niveau d'une jonction qu'il établirait avec une molécule d'ancrage à la membrane (Bramhill, 1997).

### II.2.2. FtsA et ZipA

FtsA est une protéine cytoplasmique appartenant à la famille des ATPases de l'actine et de la protéine de réponse au choc thermique Hsp70 (Bork *et al.*, 1992), elle est structurellement très proche de l'actine mais la signification de cette ressemblance n'est toujours pas élucidée (van den Ent et Lowe, 2000). FtsA est la deuxième Fts à être recrutée au site division, sa localisation dépend entièrement de la formation de l'anneau Z (Addinall et Lutkenhaus, 1996), son interaction avec FtsZ a été montrée par double hybride de levure (Din *et al.*, 1998; Ma et Margolin, 1999; Yan *et al.*, 2000). Le rapport moléculaire dans la cellule entre FtsA et FtsZ est de 1:100, il est essentiel à la division et indique que seule une partie des molécules de FtsZ interagit avec les molécules de FtsA (Dai et Lutkenhaus, 1992; Dewar *et al.*, 1992). L'activité d'hydrolyse de l'ATP par FtsA pourrait générer une part de l'énergie nécessaire à la constriction du septum (Sanchez *et al.*, 1994).

La protéine ZipA, pour FtsZ interacting protein A, possède un domaine cytoplasmique lié à la membrane interne par son extrémité N-terminale (Ohashi *et al.*, 2002) et constitue de ce fait le meilleur candidat pour un rôle d'ancrage de FtsZ à la membrane interne. ZipA est recrutée très tôt au site de division, sa localisation dépend de FtsZ, avec qui une interaction a été démontrée par chromatographie d'affinité (Hale et de Boer, 1997). La quantité de ZipA a été estimée entre 200 et 2000 molécules par cellule (Hale et de Boer, 1997), elle n'interagit donc qu'avec une partie des molécules de FtsZ. Comme FtsZ, seulement 30% des molécules de ZipA ont une localisation septale et un renouvellement constant de ces molécules a été mis en évidence (Errington *et al.*, 2003; Hale et de Boer, 1997; Stricker *et al.*, 2002). Il se pourrait donc que la dynamique des deux protéines reflète non pas le mouvement individuel de

chacune d'entre elles mais le mouvement d'un complexe FtsZ-ZipA (Errington *et al.*, 2003; Stricker *et al.*, 2002).

L'anneau Z peut se former en l'absence de FtsA ou ZipA, mais pas en l'absence des deux (Pichoff et Lutkenhaus, 2002). Ces deux protéines auraient donc un rôle redondant au niveau de l'assemblage de l'anneau Z, elles sont en revanche toutes deux requises pour sa constriction (Addinall *et al.*, 1996; Addinall et Lutkenhaus, 1996; Begg et Donachie, 1985; Hale et de Boer, 1997; Pichoff et Lutkenhaus, 2002). Aucun homologue de ZipA n'a été rapporté dans les autres genres bactériens, excepté chez *Haemophilus influenzae* (RayChaudhuri, 1999).

### II.2.3. FtsK

FtsK intervient dans les dernières étapes de la division cellulaire. Le domaine N-terminal de la protéine est essentiel à la division et contient quatre segments transmembranaires (Begg *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1998). L'implication de son domaine cytoplasmique dans la ségrégation des chromosomes (Errington *et al.*, 2003) suggère que FtsK contribuerait au positionnement correct de la division entre les deux chromosomes nouvellement dupliqués (Aussel *et al.*, 2002). La protéine est très souvent représentée dans les différents genres bactériens.

### II.2.4. FtsQ/DivIB, FtsL/DivIC et FtsB(YgbQ)

*E. coli* ne compte qu'une vingtaine de molécules de FtsQ par cellule (Carson *et al.*, 1991). FtsQ possède une courte région cytoplasmique N-terminale, reliée à un domaine périplasmique par une hélice transmembranaire (Carson *et al.*, 1991). Son recrutement au site de division dépend de FtsZ et de FtsA (Chen *et al.*, 1999) mais le rôle qu'elle y tient reste inconnu. L'homologue de FtsQ chez *B. subtilis*, DivIB, est beaucoup plus abondant (Rowland *et al.*, 1997). Lorsque DivIB est inactivée, la bactérie reste viable mais la division est inhibée à température élevée (Beall et Lutkenhaus, 1989). La division peut toutefois être restaurée par une surproduction de FtsL, indiquant que la fonction principale de DivIB pourrait être de protéger FtsL d'une dégradation thermique (Daniel et Errington, 2000).

FtsL est une petite protéine essentielle à la survie cellulaire. Elle est présente entre 20 et 40 copies par cellule, et possède en aval d'une région cytoplasmique N-terminale, deux

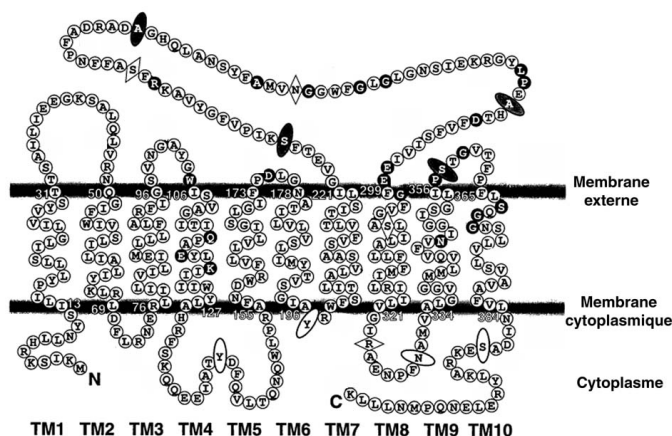
domaines transmembranaire et périplasmique nécessaires à sa localisation septale (Ghigo et Beckwith, 2000; Ghigo *et al.*, 1999; Guzman *et al.*, 1992). Chez *B. subtilis*, la fonction de FtsL semble être uniquement structurale (Sievers et Errington, 2000). *B. subtilis* possède également un second gène, homologue à celui de FtsL et essentiel à la division et la sporulation de la bactérie. Il code pour la protéine DivIC localisée au site de division (Levin et Losick, 1994). DivIC et FtsL forment des hétérodimères ou des hétéro-oligomères (Sievers et Errington, 2000) dont la stabilité dépend de la présence des autres protéines Fts (Robson *et al.*, 2002; Sievers et Errington, 2000). Individuellement, les protéines FtsL et DivIC de *B. subtilis* sont très instables, la première est stabilisée par la présence de DivIB, la deuxième par son interaction avec FtsL (Daniel et Errington, 2000; Daniel *et al.*, 1998).

Une nouvelle protéine essentielle à la division, YgbQ, a été récemment identifiée chez *E. coli* et *Vibrio cholerae*. Rebaptisée FtsB, cette protéine possède une topologie similaire à DivIC et pourrait en être un homologue. FtsB se localise au site de division et une interdépendance avec le recrutement de FtsL a été démontrée (Buddelmeijer *et al.*, 2002).

L'ensemble des interdépendances qui existent entre FtsQ/DivIB, FtsL/DivIC et FtsB argumente en faveur d'un complexe formé par ces protéines. Chez *B. subtilis*, l'inactivation de DivIB est compensée par des mutations affectant le domaine de non-liaison à la pénicilline de FtsI, ce complexe pourrait donc être lié à la synthèse du PG (Errington *et al.*, 2003).

## II.2.5. FtsW et FtsI

La localisation septale de FtsW dépend de la présence de FtsZ, FtsA, FtsQ et FtsL (Mercer et Weiss, 2002; Wang *et al.*, 1998). FtsW est une protéine intégralement membranaire essentielle à la survie cellulaire (Boyle *et al.*, 1997), celle de *S. pneumoniae* possède dix segments transmembranaires (Figure 25) (Gerard *et al.*, 2002).



**Figure 25. Topologie membranaire de la protéine FtsW de *S. pneumoniae*.** Les cercles pleins représentent les résidus hautement conservés dans différentes espèces bactériennes. (D'après Gérard *et al.*, 2002).



FtsW est un membre de la famille des protéines SEDS (« Shape, Elongation, Division and Sporulation ») qui ont la particularité d'être codées de pair avec le gène d'une PBP de classe B au sein du groupe de gènes *dcw* (Ikeda *et al.*, 1989; Ishino *et al.*, 1989; Margolin, 2000). Les souches mutantes dans lesquelles la PBP ou la protéine SEDS d'une même paire sont inactivées individuellement présentent le même phénotype, ce qui suggère une implication des deux protéines dans le même processus de synthèse du PG, l'élongation ou la septation (de Pedro *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 1989; Ishino *et al.*, 1986; Thibessard *et al.*, 2002). La paire PBP de classe B/protéine SEDS impliquée dans la division d'*E. coli* est constituée par FtsW et FtsI (PBP3) (Ishino *et al.*, 1989). Ces données génétique et phénotypique, ainsi que la topologie intégralement membranaire des protéines SEDS, indiquent que ces dernières pourraient avoir une fonction de flippase qui assurerait la translocation du lipide II de la face cytoplasmique vers la face périplasmique de la membrane interne, afin de le rendre accessible aux PBPs. Cette hypothèse n'a toutefois pas encore bénéficié de la moindre preuve.

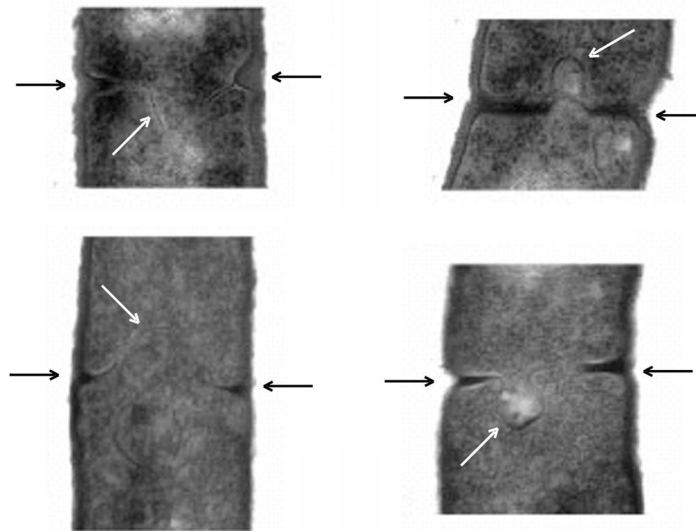
Un rôle de stabilisation de l'anneau Z a été proposé pour FtsW (Boyle *et al.*, 1997). Cette hypothèse est également controversée (Mercer et Weiss, 2002) bien qu'une interaction entre les extrémités C-terminales de FtsW et FtsZ de *Mycobacterium tuberculosis* ait été mise en évidence (Datta *et al.*, 2002).

FtsI est une PBP de haute masse moléculaire de classe B dont le rôle dans la synthèse du PG a été détaillé dans les paragraphes précédents. FtsZ, FtsA, FtsQ, FtsL et FtsW sont requises pour que FtsI soit recrutée au site de division chez *E. coli* (Mercer et Weiss, 2002; Weiss *et al.*, 1999). La localisation septale de cette PBP de classe B dépend également de son interaction avec les chaînes peptidiques du PG ou de ses précurseurs. En effet, l'ajout de  $\beta$ -lactamine qui inhibe l'activité TP de FtsI inhibe également sa localisation septale (Wang *et al.*, 1998). FtsI est essentielle à la survie de la bactérie (Spratt, 1977), ses trois domaines (cytoplasmique, transmembranaire et périplasmique) sont nécessaires à sa fonction dans la division cellulaire (Goffin *et al.*, 1996; Nguyen-Disteche *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'inhibition de son activité TP par les  $\beta$ -lactamines provoque un arrêt de la croissance septale, de la constriction des anneaux Z nouvellement formés et de la formation des futurs sites de division (Pogliano *et al.*, 1997).

La localisation septale de l'homologue de FtsI chez *B. subtilis*, PBP2b, dépend de FtsZ, DivIB, DivIC et FtsL (Daniel *et al.*, 1996; Yanouri *et al.*, 1993). La répression du gène codant pour cette protéine entraîne, comme chez *E. coli*, l'arrêt de la croissance du

septum mais ne s'accompagne pas d'un arrêt de l'invagination de la membrane cytoplasmique, ni d'une perturbation dans la formation des futurs anneaux Z (Figure 26) (Daniel *et al.*, 2000). Il a donc été proposé que l'inactivation de PBP2b chez *B. subtilis* découplerait la constriction membranaire de la synthèse de PG septal et que la formation des anneaux Z serait indépendante de PBP2b (Daniel *et al.*, 2000).

Chez *S. pneumoniae*, l'homologue de FtsI d'*E. coli* serait PBP2x.



**Figure 26. Effet de la répression du gène codant pour PBP2b sur la division de *B. subtilis*.** Observation par microscopie électronique d'une coupe longitudinale de cellules de *B. subtilis* dans lesquelles la transpeptidase PBP2b n'est pas exprimée. Les flèches noires montrent le septum qui n'est pas clos, l'arrêt de la synthèse de PG septal a été provoqué par la répression de l'expression de PBP2b. Les flèches blanches indiquent la membrane cytoplasmique qui apparaît sous forme de fines lignes noires. La continuité des lignes montre que la constriction de la membrane est achevée. Un découplage de l'invagination de la membrane et de la synthèse de PG est donc observé dans cette souche mutante. (D'après Daniel *et al.*, 2000).

## II.2.6. FtsN

FtsN est également essentielle à la division d'*E. coli*, elle présente la même topologie que FtsQ. Cette protéine n'est retrouvée que dans un faible nombre de bactéries, il n'existe pas d'homologue chez *S. pneumoniae* (Dai *et al.*, 1996). Sa séquence présente quelques similarités avec des amidases impliquées dans l'hydrolyse de la paroi, telles que Cw1C et SpoIIB chez *B. subtilis*, il a donc été proposé que FtsN catalyserait le clivage de liaisons peptidiques au niveau du PG afin de permettre l'initiation de la constriction septale (Dai *et al.*, 1993; Errington *et al.*, 2003).



## **PRESENTATION ET OBJECTIFS DES TRAVAUX**



La composition de l'enveloppe cellulaire n'est pas identique entre les bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>. Les Gram<sup>+</sup> ne possèdent pas de membrane externe et leur PG est plus épais. Ces différences impliquent des mécanismes de synthèse de la paroi et de division divergents entre les deux types de bactéries. Ces mécanismes divergent également en fonction de la morphologie de la bactérie, c'est-à-dire entre les bacilles et les coques. Or en dépit du grand nombre de coques Gram<sup>+</sup> pathogènes pour l'homme (*S. pneumoniae*, *S. aureus*), la quasi-intégralité des études portant sur les processus de croissance et de division cellulaire ont été menées sur des bacilles Gram<sup>-</sup> ou Gram<sup>+</sup> (*E. coli*, *B. subtilis*). Bien que les processus de division et de croissance cellulaire des Gram<sup>-</sup> ou des bacilles soient loin d'être élucidés, le manque de connaissances relatif aux coques Gram<sup>+</sup> est encore plus considérable, comme en témoigne la présentation bibliographique qui précède.

De par leur rôle dans la synthèse du PG, il est essentiel de mieux comprendre le fonctionnement des PBPs si nous souhaitons enrichir notre connaissance des processus de croissance et de division bactérienne. Si ces derniers sont réalisés par des complexes multienzymatiques, les PBPs doivent en faire partie. Toutefois à ce jour, très peu d'interactions moléculaires entre des PBPs et d'autres enzymes impliquées dans la synthèse pariétale ont été mises en évidence, remettant en cause l'existence de complexes en charge de l'assemblage du PG. Au sein même de notre laboratoire, les tentatives répétées de capture de partenaires potentiels des PBPs du pneumocoque se sont toutes soldées par un échec. En ce qui concerne la division, la complexité de son mécanisme justifie l'hypothèse d'un complexe protéique, un « divisome », couplant les activités enzymatiques qui y sont associées. Le recrutement d'un grand nombre de protéines au site de division des bactéries argumente en faveur de l'existence d'un tel complexe et donne des indications sur sa composition. Toutefois, les expériences d'immunofluorescence qui sont à la base de ces observations ont consisté à marquer individuellement chacune des protéines et n'ont pas permis de déterminer si leur comportement cellulaire qui était identique dans l'espace l'était aussi dans le temps, fait qui conditionne l'existence de tout complexe. Par ailleurs, peu d'interactions directes entre les composants potentiels du divisome ont pu être mises en évidence, sa réalité reste donc encore à prouver.

Les bactéries possèdent généralement une grande diversité de PBPs qui rend difficile l'étude du rôle biologique de chacun des membres de cette famille de protéines et des relations qui existent entre eux. *S. pneumoniae* est un coque Gram<sup>+</sup> commensal

des voies respiratoires chez l'homme. Il est responsable de pneumonies, de méningites, d'otites, et cause chaque année plus d'un million de morts dont un grand nombre d'enfants en bas âge. Le choix du pneumocoque comme modèle d'étude a donc été motivé non seulement par l'urgence sanitaire créée par la résistance de cette bactérie aux  $\beta$ -lactamines, par le besoin de connaissances fondamentales concernant les processus de croissance et de division des bactéries en général et plus particulièrement des coques Gram+, mais également par le nombre restreint de ses PBPs (6) qui permettait d'étudier le comportement d'une famille entière de ces protéines. Je soutiens donc dans ce présent mémoire la thèse que les six PBPs de *S. pneumoniae* sont des marqueurs cellulaires remarquables pour l'analyse des processus de division chez les coques et pour le phénomène associé de synthèse de la paroi au cours des étapes du cycle cellulaire. Ce travail a généré plusieurs découvertes inattendues. La plus remarquable d'entre elles témoigne d'une convergence des mécanismes de division chez les bacilles et chez les coques.

Au cours de ce travail, une méthode permettant d'effectuer trois marquages fluorescents différents de deux protéines et de l'ADN chromosomique a été mise au point pour *S. pneumoniae*. Dans un premier temps, un triple marquage par immunofluorescence d'une PBP, de FtsZ et des chromosomes, excellents marqueurs du cycle cellulaire, a été réalisé dans une souche sauvage de pneumocoque en phase exponentielle de croissance. Ces expériences avaient pour but d'étudier le comportement cellulaire spatial et temporel des PBPs et de répondre à trois questions : chez le pneumocoque, quelles sont les PBPs impliquées dans la croissance ou la division de la bactérie ? Quels sont les sites de synthèse du PG ? Une protéine impliquée dans la constriction de la membrane (FtsZ) a-t-elle le même comportement dynamique qu'une protéine impliquée dans la synthèse du PG (PBP) ? Trois comportements cellulaires différents ont pu être identifiés parmi les 6 PBPs de *S. pneumoniae* et un comportement relatif inattendu entre FtsZ et les PBPs impliquées dans la septation a été observé (Publication n° I).

FtsW est une autre protéine recrutée au site de division, sa fonction putative de flippase pourrait être liée à la synthèse de PG septal catalysée par certaines PBPs. Les observations issues du double marquage de FtsW avec PBP2x, confirmées avec le double marquage de FtsW avec FtsZ, argumentent en faveur d'une action concertée de FtsW et PBP2x (Publication n°II). Suite au comportement cellulaire inattendu de la D,D-CPase PBP3, PBP de faible masse moléculaire, les mêmes expériences de localisation

des PBPs et des Fts ont été réalisées dans une souche de *S. pneumoniae* déficiente en activité D,D-CPase. PBP3 s'est révélée avoir un rôle majeur dans la coordination du processus de division de la bactérie (Publication n° II). Certains des résultats obtenus, avec les souches sauvage et mutante de *S. pneumoniae*, sont allés à l'encontre des modèles habituels de croissance et de division bactérienne et nous ont conduit à les réviser et à en proposer de nouveaux.

Les aberrations morphologiques et le dysfonctionnement de la division qui apparaissent dans des souches bactériennes privées de l'activité de leur D,D-CPase(s) témoignent de la forte implication de ces protéines, qui sont supposées réguler la réticulation du PG, dans les processus de croissance et de division cellulaires. Les résultats que nous avons obtenus par immunofluorescence sont allés dans le même sens et ont motivé la deuxième partie de ce travail de thèse qui a donc consisté à étudier les relations entre la structure et la fonction de la PBP3 de *S. pneumoniae*.

Il a récemment été montré que la fonction biologique des D,D-CPases était fortement liée à leur topologie, que les différentes D,D-CPases d'une bactérie ne pouvaient pas toutes se substituer les unes aux autres et que la spécificité de chacune d'entre elles reposait sur des différences structurales au cœur de leur site actif. La résolution de la première structure tri-dimensionnelle d'une D,D-CPase, la PBP5 d'*E. coli*, a fortement amélioré la compréhension du mode d'action de ces protéines. La progression de cette connaissance nécessite à présent de pouvoir comparer la structure et la fonction de plusieurs D,D-CPases, ce qui permettrait de mieux comprendre les relations qui existent entre elles. La caractérisation enzymatique de l'unique D,D-CPase de *S. pneumoniae* a été réalisée et sa structure tri-dimensionnelle a été résolue par cristallographie des rayons X. Ces travaux ont permis de comparer le modèle de PBP3 avec celui de PBP5 et de discuter de manière structurale le rôle de PBP3 dans la division du pneumocoque.





## **MATERIELS ET METHODES**



## Avertissement aux lecteurs

Seules les méthodes utilisées au cours de l'étude structurale et fonctionnelle de PBP3 sont développées dans cette partie. Les autres méthodes utilisées au cours des travaux présentés dans ce mémoire sont décrites dans les publications n°I et n°II.

## *Techniques relatives à l'expression et la purification de sPBP3\**

### I. Techniques de biologie moléculaire

Les électrophorèses en gel d'agarose et en gel de polyacrylamide ont été effectuées suivant les instructions du manuel de laboratoire « Molecular cloning » (Maniatis *et al.*, 1982).

La purification de l'ADN génomique de la souche R6 de *S. pneumoniae* a été réalisée à l'aide du kit High Pure PCR Template Preparation (Roche). Les séquences des oligonucléotides utilisés pour amplifier le fragment d'ADN codant pour la forme tronquée de la D,D-carboxypeptidase PBP3 (sPBP3\* : Gly15 à Lys394, Figure 1A) sont indiquées dans le paragraphe « Materials and Methods » de la publication n°II. 0.04 U/ $\mu$ L d'ADN polymérase Vent (New England Biolabs), 4 ng/ $\mu$ L d'ADN génomique, 400  $\mu$ M de désoxyribonucléotides triphosphate (dNTPs) et 1  $\mu$ M de chaque oligonucléotide ont été utilisés pour l'amplification génique en chaîne (PCR). Le programme de PCR est composé de 25 cycles de trois étapes : 15 secondes à 94 °C, puis 30 secondes à 50 °C et 2 minutes à 72 °C.

Après électrophorèse en gel d'agarose, les fragments d'ADN obtenus par PCR sont extraits en utilisant le kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Les endonucléases de restriction et les enzymes de modification de l'ADN ont été utilisées selon les recommandations des fournisseurs.

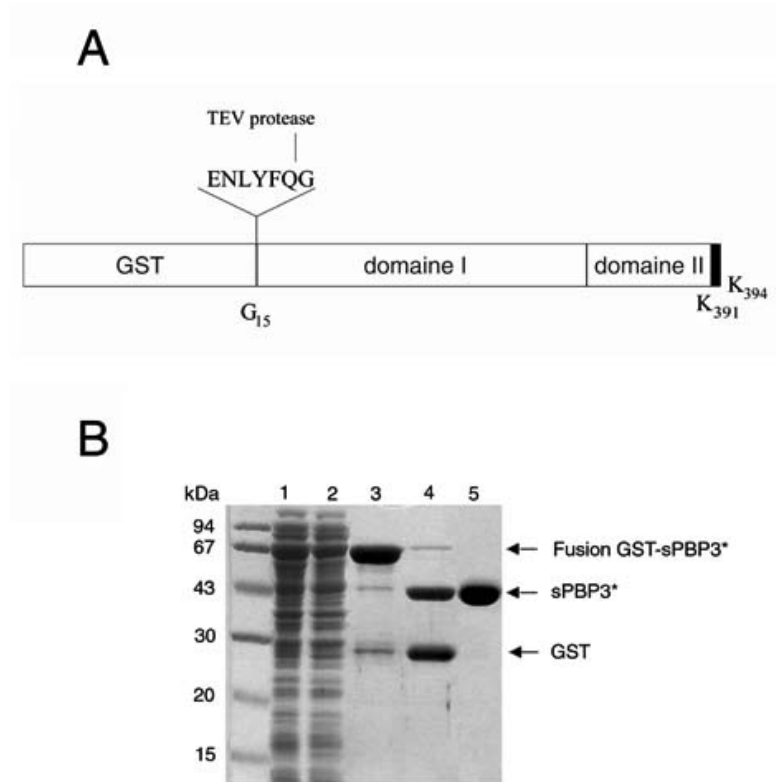
La technique de préparation des cellules chimiocompétentes par traitement au chlorure de calcium et les étapes de transformation des bactéries compétentes sont décrites dans le manuel « Molecular cloning » (Maniatis *et al.*, 1982).

La souche d'*E. coli* MC1061 a été utilisée pour sa haute efficacité de transformation et pour l'expression de sPBP3\*, son génotype est :

F<sup>-</sup>*araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)<sub>7636</sub>, *galE15*, *galK16*,  $\Delta$  (*lac*)X74, *rpsL*, *mcrA mcrB1*, *hsdR2* (rK<sup>-</sup> mK<sup>+</sup>)

## II. Construction du vecteur pGEX-sPBP3\*

Les oligonucléotides utilisés ont permis d'introduire les séquences d'ADN codant pour les sites de restriction des endonucléases *Bam*HI et *Xho*I ainsi que pour le site de clivage spécifique de la protéase TEV (Figure 1A).



**Figure 1. Clonage, expression et purification de sPBP3\* de *S. pneumoniae*.** A : Représentation schématique de la protéine résultant de la fusion entre sPBP3\* (forme soluble de PBP3 déletée du peptide signal et des 19 résidus C-terminaux) et la Glutathion S-Transférase (GST). Le site de clivage spécifique de la protéase TEV a été introduit. Le rectangle noir représente les 10 premiers résidus de l'extrémité C-terminale amphiphile de PBP3. B : Différentes étapes de production et de purification de sPBP3\*. Piste kDa : Marqueurs de poids moléculaire. Piste 1-2 : Lysat total (1) et fraction protéique soluble (2) de cellules d'*E. coli* MC1061 après induction de l'expression de la protéine de fusion GST-sPBP3\*. Piste 3 : Etape de purification sur résine Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia Biotech) : fraction d'élution de la protéine de fusion GST-sPBP3\*. Piste 4 : Etape de clivage par la protéase TEV. Piste 5 : Echantillon purifié de sPBP3\* après purification sur résine Glutathione Sepharose 4B, chromatographie d'échange d'ions et chromatographie de filtration sur gel.

Le produit de PCR purifié a été introduit au niveau du site *Srf*I du vecteur de clonage pPCR-Script Amp SK(+) (Stratagene) puis sous-cloné dans le vecteur pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences) à l'aide de la cassette de restriction *Bam*HI / *Xho*I. Ce vecteur a permis l'expression d'une protéine de fusion entre la Glutathion S-transférase et sPBP3\*, facilitant la purification par chromatographie d'affinité (Figure 1B).

### III. Expression et purification de sBPB3\*

La production et la purification de la forme recombinante sBPB3\* de la D,D-carboxypeptidase de *S. pneumoniae* est décrite dans le paragraphe « Materials and Methods » de la publication n°II. La figure 1B montre le résultat de différentes étapes du protocole d'expression et de purification.

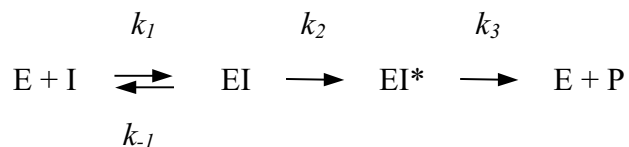
#### *Etude fonctionnelle de sBPB3\**

##### I. Titration de la quantité de sBPB3\* active

La concentration en sBPB3\* a été déterminée par la méthode de Bradford (Smith *et al.*, 1985; van Kley et Hale, 1977) et l'homogénéité fonctionnelle de la protéine a été évaluée par titration des sites actifs présents dans la préparation en utilisant de la benzylpénicilline tritiée (20 Ci/mmol, 1 mCi/mL; Amersham Pharmacia). 2 et 5  $\mu$ M de sBPB3\* purifiée ont été incubées pendant 15 minutes à 37 °C dans un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM de NaCl et 0.01 à 20  $\mu$ M de [<sup>3</sup>H]-benzylpénicilline. Après soumission des échantillons à une électrophorèse sur gel SDS-PAGE 12%, une analyse qualitative et quantitative de la fixation de la [<sup>3</sup>H]-benzylpénicilline aux protéines a été réalisée. L'analyse qualitative consiste à colorer le gel au bleu de Coomassie et d'en prendre une photographie, puis à décolorer le gel, à l'incuber dans une solution d'Amplify (Amersham) et enfin à le sécher avant de le révéler par autoradiographie. La photographie du gel est ensuite comparée à l'autoradiographie pour vérifier la capacité de la protéine à fixer la pénicilline. L'analyse quantitative consiste à découper chaque bande protéique du gel et de mesurer la radioactivité pour chacune d'elles. Les bandes sont immergées dans 5 ml de liquide à scintillation (cocktail LSC, Picofluor 15, Packard) et la mesure du nombre de coups par minutes (Packard model 2100TR) permet de calculer la quantité de protéine active dans chaque bande.

## II. Affinité de sPBP3\* pour différents antibiotiques

L'interaction des PBPs avec les  $\beta$ -lactamines peut être représentée par la formulation ci-après :



où E représente l'enzyme et I l'antibiotique. EI est le complexe non covalent, EI\* correspond à l'acyl-enzyme et P est l'antibiotique inactivé.  $K = k_{-1}/k_1$  correspond à la constante de dissociation du complexe non covalent et  $k_2$  et  $k_3$  aux constantes de vitesse d'acylation et de désacylation (Adam *et al.*, 1997; Frere *et al.*, 1975; Fuad *et al.*, 1976; Jamin *et al.*, 1993).

La réaction de formation du complexe covalent acyl-enzyme est trop rapide pour pouvoir mesurer individuellement les paramètres K et  $k_2$ . L'efficacité d'acylation peut être déterminée par la mesure du rapport  $k_2/K$  par spectrofluorescence. Il s'agit de suivre la décroissance de la fluorescence intrinsèque de la PBP lors de la fixation d'une  $\beta$ -lactamine dans son site actif. Cette méthode a été testée sur sPBP3\* mais la variation de l'environnement local du site actif n'a pas provoqué une atténuation de fluorescence suffisante pour mesurer la vitesse d'acylation de la protéine. Nous nous sommes donc restreints à une mesure de l'affinité relative de sPBP3\* pour 5  $\beta$ -lactamines. Cette méthode est basée sur la fixation compétitive de deux antibiotiques à la protéine, en prenant pour référence la benzylpénicilline. 2  $\mu$ M de sPBP3\* ont été incubé simultanément avec 2  $\mu$ M de [ $^3$ H]-benzylpénicilline et des concentrations variables de chaque antibiotique dans un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0) 200 mM NaCl. Après une incubation de 15 minutes à 37 °C, la quantité de radioactivité a été évaluée comme décrit dans le paragraphe précédent.

## III. Vitesse de désacylation des complexes pénicilloyl-sPBP3\*

L'efficacité de désacylation est représentée par le paramètre  $k_3$  qui est mesuré en suivant la diminution des complexes acyl-enzyme au cours du temps selon une loi de cinétique du premier ordre :

$$-k_3 t = \ln [EI^*]_t / [EI^*]_0$$

$[EI^*]_0$  est la concentration initiale en acyl-enzyme au temps  $t_0$  et  $[EI^*]_t$  est la concentration à un instant  $t$ .

2  $\mu\text{M}$  de sPBP3\* sont saturés par 2  $\mu\text{M}$  de [ $^3\text{H}$ ]-benzylpenicillin à 37 °C pendant 15 minutes dans un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0) et 200 mM de NaCl. Un excès de benzylpénicilline froide (15 mM) est alors rajouté et la réaction est prolongée durant plusieurs heures à 37 °C. Des aliquots sont prélevés régulièrement et soumis à une analyse qualitative et quantitative de radioactivité comme décrit dans le paragraphe I.1

#### **IV. Efficacité d'hydrolyse du pseudo-substrat S2d**

Le S2d ou acide *N*-benzoyl-D-alanylmercaptoacétique possède une fonction thiolester analogue des liaisons peptidiques présentes dans le peptidoglycane. Les PBPs ont la capacité d'hydrolyser le S2d et la détermination de l'efficacité d'hydrolyse du S2d permet donc d'évaluer la vitesse de la réaction enzymatique naturelle. Cette réaction est en outre inhibée par les  $\beta$ -lactamines.

L'hydrolyse du S2d libère un groupe thiol que l'on couple au 4,4'-dithiodipyridine. Le produit résultant est mesuré en suivant l'augmentation de la densité optique à 325 nm (le coefficient d'extinction de ce produit est égal à  $19800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Zhao *et al.*, 1997). Le volume réactionnel est de 1 mL, il est composé d'une solution tampon de phosphate de potassium à 52 mM pH 7.0, de 0.2 à 2 mM de substrat S2d, de 0.8 mM de 4,4'-dithiodipyridine et de 2 à 200  $\mu\text{g}$  d'enzyme. L'augmentation de l'absorbance est mesurée pendant 1 minute à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman, DU 640) thermostaté à 37°C.

### ***DETERMINATION DE LA STRUCTURE DE PBP3***

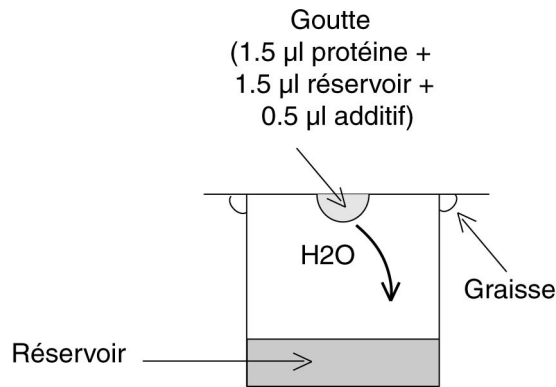
#### **I. Cristallisation de sPBP3\* native**

##### **I.1. Technique de la goutte suspendue**

La technique employée pour la cristallisation est celle de la goutte suspendue, suivant la méthode de la diffusion de vapeur (McPherson *et al.*, 1995). Dans ce système, une solution réservoir de 1 ml contenant l'agent précipitant, un tampon et éventuellement des additifs



s'équilibre(nt) avec une goutte de quelques microlitres contenant la protéine et généralement les mêmes éléments que le réservoir mais moins concentrés. La goutte est déposée à la surface d'une lamelle en verre siliconé et l'étanchéité du dispositif est assurée par de la graisse (Figure 2).



**Figure 2. Dispositif de cristallisation par la méthode de la goutte suspendue.**

## I.2. Cryocongélation des cristaux de sPBP3\*

La qualité des cristaux de protéine plongés dans un faisceau de rayons X peut rapidement s'altérer à cause de la formation de radicaux libres. Pour limiter ce problème, nous avons utilisé une méthode classique de cryoprotection qui consiste à tremper les cristaux dans une solution mère additionnée de molécules cryoprotectantes, puis à les congeler soit en les plongeant dans de l'azote liquide pour être stockés, soit en les soumettant à un flux d'azote gazeux à environ 100 K dans le cas d'une expérience de diffraction immédiate. La composition de la solution mère à laquelle est(sont) ajouté(s) le(s) cryoprotectant(s) est proche de celle de la solution de cristallisation et le choix du cryoprotectant doit tenir compte de différents facteurs.

Le cryoprotectant doit en premier lieu empêcher la formation de glace qui détériore le cristal et dont la diffraction interfère avec celle de l'échantillon. Sachant par ailleurs que la concentration en cryoprotectant est proportionnelle à son pouvoir protecteur et que des concentrations trop fortes en cryoprotectant peuvent entraîner une dégradation du cristal, il faut donc déterminer le type de cryoprotectant et la concentration qui seront les moins agressives pour le cristal et qui éviteront l'apparition d'anneaux de glace.

## II. Méthodes de phasage

### II.1. Le remplacement moléculaire

La méthode du remplacement moléculaire s'appuie sur la connaissance d'une structure de protéine déjà résolue et supposée posséder des similitudes de structure tridimensionnelle avec la protéine étudiée. On considère généralement que l'identité de séquence entre deux protéines doit être supérieure à 50% pour donner une issue favorable à la méthode du remplacement moléculaire.

La méthode consiste à placer le modèle connu dans la maille du cristal de la protéine étudiée en déterminant une matrice de rotation R et un vecteur de translation T permettant de passer des coordonnées du modèle connu à celles de la protéine étudiée. Une première estimation des phases pour les facteurs de structure peut alors être calculée. La recherche des opérateurs R et T se fait grâce à des fonctions de corrélation permettant de comparer les amplitudes mesurées et les amplitudes calculées à partir du modèle.

### II.2. La méthode du remplacement isomorphe multiple (MIR), trempage des cristaux natifs de sPBP3\* en présence de complexes d'atomes lourds

La méthode du remplacement isomorphe multiple (MIR) se base sur une comparaison des signaux de diffraction mesurés sur des cristaux natifs et sur des cristaux dérivés, c'est-à-dire des cristaux sur lesquels ont été fixé des atomes lourds (dont le nombre d'électrons est élevé). Les atomes lourds modifient le facteur de structure, cette modification peut être exploitée pour retrouver la phase de chaque facteur de structure dans la mesure où l'on parvient à déterminer la position de ces atomes dans la maille. Ceci nécessite que les cristaux dérivés soient isomorphes des cristaux natifs, c'est-à-dire que la variation de leurs paramètres de maille soit minime (<1%), et que les changements structuraux liés éventuellement à la fixation de ces atomes soient négligeables. Plus il y a de données de cristaux dérivés différents (site, nombre ou type d'atomes lourds différents) plus les phases pourront être calculées précisément. En général, une forte amélioration est apportée avec le deuxième dérivé.

Dans un premier temps, nous avons entrepris une campagne d'introduction des atomes lourds dans les cristaux par trempage. PBP3 ne contenant aucune cystéine, nous n'avons pas

pu utiliser de complexes de mercure. En revanche, nous avons testé trois composés de platine car ce dernier se fixe souvent à l'atome de soufre des méthionines qui sont au nombre de 9 chez PBP3. Le citrate étant un agent chélateur de certains métaux lourds, les trempages ont du être effectués dans une solution contenant 0.2 M de tartrate mixte de potassium et de sodium, 0.1 M d'acétate de sodium pH 5.6, 1.9 M de sulfate d'ammonium et 140 mM de iodure de sodium.

### **II.3. La méthode MAD**

#### **II.3.1. Principe**

Au voisinage d'une énergie correspondant à des transitions électroniques, appelée le seuil d'absorption, le pouvoir de diffusion d'un atome subit des variations importantes qui peuvent être décrites en ajoutant au facteur de diffusion « normal » (indépendant de la longueur d'onde) un terme de diffusion « anomal » dépendant de la longueur d'onde. Le principe de la méthode MAD (Multiwavelength Anomalous Diffraction) repose sur l'utilisation de la variation de la diffusion anormale d'atomes lourds en fonction de la longueur d'onde incidente. Le même cristal joue le rôle d'échantillon natif lorsque les données sont enregistrées à une longueur d'onde en dehors du seuil d'absorption et d'échantillons dérivés lorsque les données sont collectées à deux autres longueurs d'onde correspondant au pic et au point d'inflexion du seuil d'absorption.

Cette méthode présente donc l'avantage d'être économique puisqu'elle ne requiert qu'un seul cristal, ce qui élimine également les problèmes de non-isomorphisme. Toutefois, elle nécessite l'utilisation d'un rayonnement synchrotron et un enregistrement de données de très bonne qualité car le signal anomal est en général très faible, souvent légèrement supérieur au bruit de fond. Des techniques d'ingénierie des protéines permettent de remplacer le soufre des résidus méthionines par des atomes de sélénium dont le seuil d'absorption est accessible sur certaines installations de rayonnement synchrotron.

Nous avons utilisé cette méthode pour résoudre la structure de sPBP3\*.

### II.3.2. Production et purification du dérivé sélénié de sPBP3\*

Les bactéries *E. coli* utilisées pour la surexpression de l'enzyme recombinante séléniée proviennent de la souche B834 qui est auxotrophe pour la méthionine. Les bactéries sont cultivées à 37°C dans un milieu M9 additionné de 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mg/L FeSO<sub>4</sub>, 0.4% de D-glucose, 1 mg/L de vitamine (riboflavine, niacinamide, pyridoxine monochloride et thiamine), 40 mg/L d'acides nucléiques (adénine, guanosine, uracile et thymine), 100 mg/L d'ampicilline et 40 mg/L de chaque acide aminé. La méthionine est remplacée progressivement par la séléno-méthionine au cours de 5 étapes d'enrichissement du milieu de culture qui va contenir 0%, 20%, 50%, 80% puis 100% de séléno-méthionine (Figure 3).

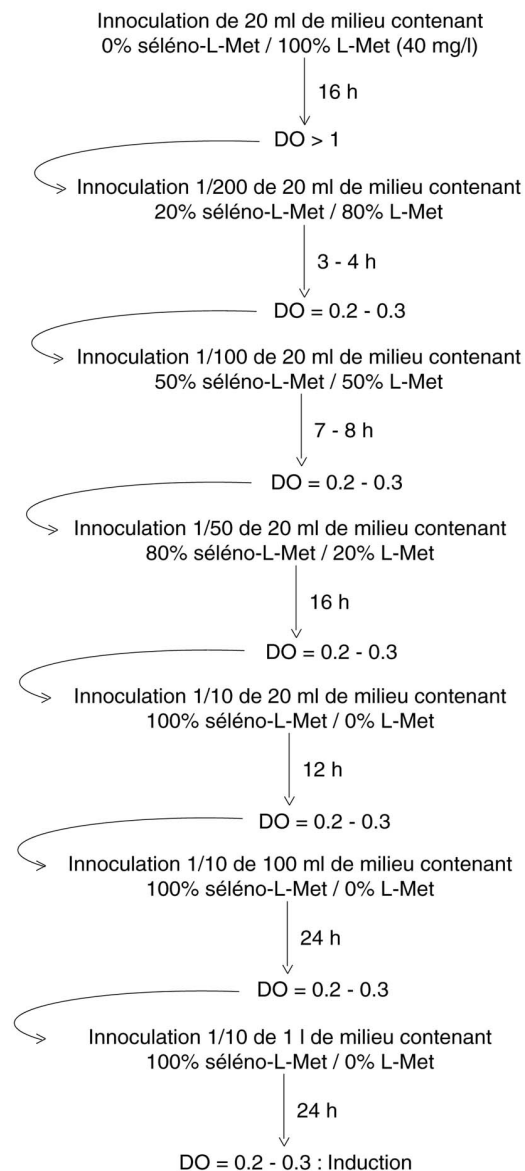


Figure 3. Protocole de production du dérivé sélénié de sPBP3\*.

Les milieux à chaque étape d'enrichissement sont ensemencés par une dilution de la culture précédente dont la densité optique ne doit pas avoir dépassé la valeur de 0.2-0.3 à 600 nm. En effet, au-delà de cette densité optique, une partie des cellules commencent à lyser, entraînant la libération d'ions sélénium toxiques pour les bactéries. Une dilution même faible de ces cultures bactériennes ne parvient pas à coloniser un milieu frais. A la fin du protocole, la surexpression de sPBP3\* est induite par l'ajout de 0.5 mM d'IPTG à la culture qui est placée pendant 16h à 23°C. Le protocole de purification de sPBP3\* sélénée est identique à celui de la protéine sauvage (publication n°II), à la différence que les tampons sont additionnés de 10 mM de DTT pour réduire l'oxydation des séléénométhionines. Le taux d'expression de la protéine sélénée est dix fois inférieur à celui de la protéine sauvage. Par ailleurs, sPBP3\* sélénée est moins soluble et moins stable que sPBP3\* sauvage, elle doit donc être utilisée à une concentration inférieure à celle de la protéine sauvage (respectivement de 2.5 à 3.5 mg/mL et de 3.5 à 4.5 mg/mL) et plus rapidement (respectivement jusqu'à 2 semaines et 1 mois après l'extraction de la protéine).

## ***Technique d'immuno-fluorescence***

### **I. Fixation des bactéries**

Afin de visualiser le plus grand nombre de bactéries en division, les cultures de la souche R6 de *S. pneumoniae* doivent être fixées au cours de la phase exponentielle de croissance ( $DO_{600\text{ nm}} = 0.2$  à  $0.6$ ). Un protocole de fixation des cellules doit être mis au point en faisant varier les concentrations en agents fixateurs (paraformaldéhyde, glutaraldéhyde), en agents perméabilisants (lysozyme, méthanol) ainsi qu'en faisant varier les différentes durées d'incubation. Un échantillon de culture bactérienne peut être fixé par une incubation de 15 à 30 minutes à température ambiante, puis 30 à 45 minutes sur la glace en présence de 2.5% à 5% de paraformaldéhyde (w/v), 0.03 à 0.3% de glutaraldéhyde (v/v) et 30 mM de phosphate de sodium à pH 7.4. Les cellules doivent ensuite être lavées 3 fois avec une solution de PBS (phosphate buffer saline) et resuspendues dans une solution contenant 50 mM de glucose, 20 mM de Tris-HCl à pH 7.5 et 10 mM d'EDTA. Le lysozyme fraîchement préparé peut être ajouté à une concentration allant de 0.1 mg/mL à 0.5 mg/mL, l'incubation est prolongée de 2 à 5 minutes à température ambiante avant de transférer les cellules sur des lames de poly L-lysine (Poy Prep<sup>TM</sup> slides, Sigma).

Les lames doivent ensuite être lavées avec une solution de PBS pour éliminer l'excès de cellules, trempées de 5 à 15 min dans du méthanol à  $-20^{\circ}\text{C}$ , puis éventuellement 30 secondes dans de l'acétone à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les lames sont ensuite séchées à l'air libre, réhydratées par du PBS et les groupements L-lysine sont saturés par une incubation des lames dans une solution de PBS contenant 2% (w/v) de BSA (bovine serum albumine) (PBS-BSA) ou 5% (w/v) de lait en poudre (PBS-Lait).

## **II. Immuno-marquage des protéines**

Les cellules sont ensuite mises en présence d'une dilution adéquate des anticorps primaires (1:1 à 1:1000) dans du PBS-BSA ou du PBS-Lait pendant 45 à 120 minutes. Si deux anticorps primaires différents sont utilisés, il peut être préférable de réaliser les deux incubations séparément. Les anticorps dirigés contre la protéine possédant le plus faible nombre de copies dans la cellule devront être utilisés en premier.

Les lames doivent être lavées au PBS pour éliminer la solution d'anticorps primaires avant de réaliser l'étape d'incubation avec les anticorps secondaires (dilution de 1:50 à 1:400, 45 à 120 minutes). Ici encore, dans le cas d'un double marquage protéique, il peut être préférable de réaliser séparément les incubations avec les solutions d'anticorps secondaires.

La coloration de l'ADN à l'aide du 4',6-diaminido-2-phénylindole (DAPI) peut être réalisée en parallèle ou à la suite de l'étape d'incubation avec les anticorps secondaires. La concentration en DAPI peut varier de 2 à 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Les lames sont finalement lavées au PBS avant le montage des lamelles à l'aide de la solution Eukitt (Labonord).



## **PRESENTATION DE LA PUBLICATION N°I**





## **Présentation de la publication n° 1**

Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O. et Vernet, T. (2003). Growth and division of *Streptococcus pneumoniae* : localization of the high molecular weight Penicillin-Binding Proteins during the cell cycle. *Molecular Microbiology* **50**(3): 845-855.

### **Objectif**

*S. pneumoniae* possède 5 PBPs de haute masse moléculaire parmi lesquelles 3 sont des enzymes bi-fonctionnelles de classe A, PBP1a, PBP2a et PBP1b et 2 sont des enzymes mono-fonctionnelles de classe B, PBP2x et PBP2b. Le rôle spécifique des PBPs de classe A dans la synthèse du peptidoglycane n'est pas connu. Au sein de la classe B, PBP2x, homologue de FtsI chez *E. coli*, catalyserait la synthèse de peptidoglycane septal alors que PBP2b serait impliqué dans la synthèse de peptidoglycane non-septal. Les travaux décrits dans cette publication avaient pour objectif de déterminer le rôle des PBPs de haute masse moléculaire à travers l'analyse de leur localisation au cours du cycle cellulaire chez *S. pneumoniae*.

### ***S. pneumoniae* possède trois sites de synthèse localisée de peptidoglycane**

La première étape de ce travail visait à analyser la localisation cellulaire des PBPs de haute masse moléculaire dans le but d'identifier des comportements spécifiques donnant des indications sur les sites de synthèse de peptidoglycane chez le pneumocoque et sur le rôle joué par chacune des PBPs.

Toutes les PBPs adoptent une structure annulaire et deux comportements cellulaires typiques ont été identifiés. Si l'on pose l'hypothèse qu'une protéine exerce son activité au site de localisation, nos résultats montrent que le pneumocoque possède trois sites de synthèse localisée de peptidoglycane. Le premier est le site de division au niveau duquel est catalysé l'assemblage du septum. Les deux autres sont des excroissances équatoriales, réparties symétriquement par rapport au septum, au niveau desquelles est catalysée une synthèse périphérique de peptidoglycane.

## **PBP2x et PBP1a se localisent spécifiquement au site de division et leur structure annulaire apparente se contracte avec un retard sur l'anneau de FtsZ**

Par une technique de double marquage, nous avons pu observer la dynamique de la localisation de chaque PBP au cours du cycle cellulaire. En effet, dans chaque expérience nous avons utilisé la protéine FtsZ comme marqueur des étapes du cycle cellulaire. Nous avons confirmé le rôle de PBP2x et établi celui de PBP1a dans la synthèse de peptidoglycane septal. Avant que les cellules n'entrent en division, PBP2x et PBP1a co-localisent au site de division avec FtsZ ; la constriction de l'anneau Z précède de 5 minutes celui des structures annulaires apparentes formées par les deux PBPs. Le décalage temporel persiste jusqu'à ce que les PBPs quittent l'ancien septum et qu'elles soient recrutées aux futurs sites de division des deux cellules filles.

## **PBP2b et PBP2a se localisent spécifiquement sur les protubérances équatoriales**

PBP2b et PBP2a présentent une localisation exclusivement équatoriale. Elles adoptent une structure annulaire, localisée initialement au centre de la cellule, qui se divise au cours du cycle cellulaire en deux anneaux équatoriaux symétriques. Leur position coïncide avec le futur site de division des deux cellules filles situé au niveau des anneaux composés d'excroissance de peptidoglycane visibles en microscopie électronique à la surface de la paroi du pneumocoque. La séparation des anneaux équatoriaux est concomitante à la constriction de l'anneau Z mais précède celles des structures annulaires formées par PBP2x et PBP1a.

## **Le cas particulier de PBP1b**

PBP1b a été observée au niveau du site de division ou au niveau des deux sites équatoriaux mais jamais sur les trois sites de synthèse dans une même cellule. De toutes les PBPs de haute masse moléculaire, seule PBP1b peut donc adopter l'un ou l'autre des deux comportements cellulaires dans une souche sauvage de pneumocoque.

## **La localisation cellulaire des PBPs de classe A traduit la redondance apparente de leur activité**

La redondance fonctionnelle apparente des PBPs de classe A de *S. pneumoniae* a été décrite dans la littérature. PBP1a, PBP2a et PBP1b peuvent être inactivées individuellement sans que la croissance et la division du pneumocoque en soit affectées. Le comportement dual de PBP1b semble le désigner comme candidat unique au remplacement des autres PBPs. Cette hypothèse n'était toutefois pas en accord avec le fait que le pneumocoque est toujours viable en absence des paires PBP1a/PBP1b ou PBP2a/PBP1b et que seule la double délétion de PBP1a/PBP2a est létale. La deuxième partie de notre travail a donc consisté à étudier le comportement cellulaire des PBPs de haute masse moléculaire restantes dans les souches mutantes de *S. pneumoniae* possédant les simples ou les doubles délétions de PBPs de classe A.

La localisation des PBPs de classe B et de PBP1b de classe A ne varie pas dans tous ces mutants et celle des PBP1a et PBP2a reste identique lorsque seule PBP1b est inactivée. En revanche, l'inactivation de PBP1a ou de PBP2a dans les simples ou doubles mutants s'accompagne d'une redistribution cellulaire de la PBP restante : dans les cellules privées de PBP2a, PBP1a présente une localisation encore majoritairement septale mais peut alternativement adopter une localisation équatoriale. De même, en absence de PBP1a, PBP2a présente majoritairement une localisation équatoriale mais peut être observée alternativement au septum des cellules mutantes. Les deux types de localisation sont ici aussi exclusifs : PBP1a et PBP2a ne peuvent pas être présentes à la fois aux sites de synthèse septal et équatoriaux dans une même cellule mutante.

## **Conclusion**

Si l'on considère que les PBPs exercent leur activité sur les sites au niveau desquels elles se localisent, PBP2b et PBP2a sont impliquées spécifiquement dans la synthèse du peptidoglycane périphérique. Cette dernière débute avant celle du septum qui implique spécifiquement PBP2x et PBP1a. Par ailleurs, la synthèse du peptidoglycane septal accuse un retard sur la constriction de la membrane assurée par l'anneau de FtsZ. Les deux processus que l'on pensait entièrement couplés et synchronisés au sein d'un complexe multienzymatique

en charge de la division bactérienne semblent en fait soit en partie, soit totalement découplés. PBP1a et PBP2a sont capables de se remplacer mutuellement. PBP1b participe aux deux types de synthèse du peptidoglycane et il est possible qu'elle puisse en partie compenser le manque de PBP1a ou de PBP2a. En revanche, la perte simultanée de PBP1a et PBP2a ne peut pas être compensée par la seule présence de PBP1b.

**PUBLICATION N°1**



# Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle

Cécile Morlot, André Zapun, Otto Dideberg and Thierry Vernet\*

*Institut de Biologie Structurale J. -P. Ebel (CEA/CNRS/UJF, UMR 5075), 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France.*

## Summary

**The bacterial peptidoglycan, the main component of the cell wall, is synthesized by the penicillin-binding proteins (PBPs). We used immunofluorescence microscopy to determine the cellular localization of all the high molecular weight PBPs of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*, for a wild type and for several PBP-deficient strains. Progression through the cell cycle was investigated by the simultaneous labelling of DNA and the FtsZ protein. Our main findings are: (i) the temporal dissociation of cell wall synthesis, inferred by the localization of PBP2x and PBP1a, from the constriction of the FtsZ-ring; (ii) the localization of PBP2b and PBP2a at duplicated equatorial sites indicating the existence of peripheral peptidoglycan synthesis, which implies a similarity between the mechanism of cell division in bacilli and streptococci; (iii) the abnormal localization of some class A PBPs in PBP-defective mutants which may explain the apparent redundancy of these proteins in *S. pneumoniae*.**

## Introduction

The peptidoglycan is the principal stress bearing and shape-determining constituent of the cell wall and its integrity is essential for bacteria. It is a molecular mesh of glycan strands of repeating disaccharide units cross-linked by peptide bridges. Several high molecular weight penicillin-binding proteins (PBPs) participate in the synthesis of the peptidoglycan through glycosyltransferase activities, which catalyse polymerization of glycan strands, and through transpeptidase activities, which form the peptide bridges. Class A PBPs possess both glycosyltrans-

ferase and transpeptidase activities, whereas class B PBPs are monofunctional transpeptidases (Ghuysen, 1991). Low molecular weight PBPs constitute a third group with a D,D-carboxypeptidase activity.  $\beta$ -Lactam antibiotics, such as penicillins and cephalosporins, inhibit both the transpeptidase and the D,D-carboxypeptidase reactions.

Cell wall synthesis can be grossly divided in two stages: the longitudinal wall growth (or elongation, as most studies have dealt with rod-shaped bacteria that double in length during this part of wall synthesis) and the wall growth linked to cell division or septation. Bacterial genomes generally encode two PBPs of class B, one involved in each stage of the peptidoglycan synthesis.

In *Escherichia coli*, PBP3 (FtsI) belongs to a group of essential proteins involved in division (Nanninga, 1991; Bramhill, 1997). This set of proteins, conserved in all cell wall synthesizing eubacteria, are thought to form a complex coordinating nucleoid segregation, membrane constriction, septal peptidoglycan synthesis and possibly the final event of membrane fusion. Genetic and localization studies in *E. coli* and *Bacillus subtilis* showed that they are recruited to the division site in the following conditional order: FtsZ, FtsA, FtsK, FtsQ, FtsL/FtsB, FtsW and FtsI (Errington, 2001; Buddelmeijer and Beckwith, 2002). The nomenclature of these proteins is derived from the filamentous phenotype adopted by temperature sensitive mutants that cannot divide at restrictive temperature. The first recruit to the division site, FtsZ, is a cytoplasmic protein that polymerizes in a ring-like structure (Addinall and Holland, 2002). Constriction of the FtsZ-ring has been proposed to drive the division process, in particular the membrane invagination. The last protein recruited to the site of division is FtsI, which is a class B PBP involved in septal peptidoglycan synthesis (Botta and Park, 1981). The localization of FtsI to the division site depends on FtsZ and the other intervening Fts proteins. However, some peptidoglycan synthesis that is independent of FtsI is observed at the division site of *E. coli*. This FtsI-independent but division-specific synthesis of peptidoglycan depends on the formation of the FtsZ-ring, but is independent of the other Fts proteins (de Pedro *et al.*, 1997).

Although peptidoglycan synthesis requires glycosyltransferase activity, the respective role of the different

Accepted 8 August, 2003. \*For correspondence. E-mail thierry.vernet@ibs.fr; Tel. (+33) 4 38 78 96 81; Fax (+33) 4 38 78 54 94.



class A PBPs in the growth and division phases is unclear. Among the three class A PBPs from *B. subtilis*, only PBP1 has been studied by immunofluorescence (Pedersen *et al.*, 1999). The septal localization of PBP1 is consistent with the septation defects exhibited by a *B. subtilis* strain deficient in PBP1 (Murray *et al.*, 1998).

In this work, we present the localization by immunofluorescence microscopy of all the high molecular weight PBPs from *S. pneumoniae*, a major human pathogen causing severe diseases such as pneumonia, otitis or meningitis. *Streptococcus pneumoniae* is a football-shaped Gram-positive bacteria, encircled by an equatorial ring apparently formed by an out-growth of the cell wall (Tomasz, 2000). Electron micrographs showed that the initial equatorial ring is duplicated and that the two resulting rings are progressively separated. These duplicated equatorial rings mark the future division site of the daughter cells and undergo duplication during the next cell cycle (Tomasz, 2000). Early immunofluorescence and radioautographic studies of *Streptococcus pyogenes* and *S. pneumoniae*, respectively, demonstrated that newly synthesized cell wall is found in a restricted zone between the duplicated equatorial rings (Cole and Hahn, 1962; Briles and Tomasz, 1970). These known facts are summarized in Fig. 1, which also presents the cellular nomenclature used in this paper.

*Streptococcus pneumoniae* has five high molecular weight PBPs including two class B PBPs called PBP2x and PBP2b. Both proteins are likely to be essential as attempts to isolate deletion mutants failed (Kell *et al.*, 1993). As the *pbp2x* gene is located in a cluster devoted to division (Massidda *et al.*, 1998), PBP2x is generally considered to be involved in cell division, whereas PBP2b would function during the growth phase. There is, however, no direct experimental evidence for the participation of these PBPs in either phase of peptidoglycan synthesis. The three pneumococcal class A PBPs are PBP1a, PBP1b and PBP2a. None was found essential in the

sense that single mutants showed no obvious phenotype (Hoskins *et al.*, 1999; Paik *et al.*, 1999). Inactivation of PBP1b together with PBP1a or PBP2a was not lethal although these double mutants exhibited defects in positioning of the septum. In contrast, the simultaneous inactivation of both PBP1a and PBP2a could not be obtained suggesting that this double mutation is lethal (Paik *et al.*, 1999). The specific roles of the class A PBPs in the septation or growth process of *S. pneumoniae* remains unknown.

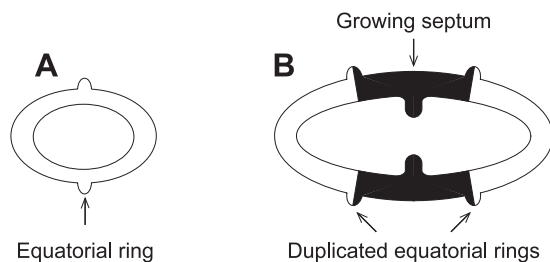
Immunolabelling of the complete high molecular weight PBPs repertoire of *S. pneumoniae* with simultaneous staining of FtsZ and DNA has allowed us to analyse the localization and dynamics of the machineries of peptidoglycan synthesis during the cell cycle. One of our major finding is the unexpected uncoupling of peptidoglycan synthesis from the FtsZ-ring constriction during septation. Another set of results relates to the identity of PBPs involved in septal versus peripheral peptidoglycan synthesis, and these observations suggest a common scheme for the division of streptococci and bacilli. Finally, the redundancy of some class A PBPs may be explained by the relocalization of the remaining class A proteins in mutant strains during the process of cell division.

## Results

### Immunofluorescence and cell cycle timing

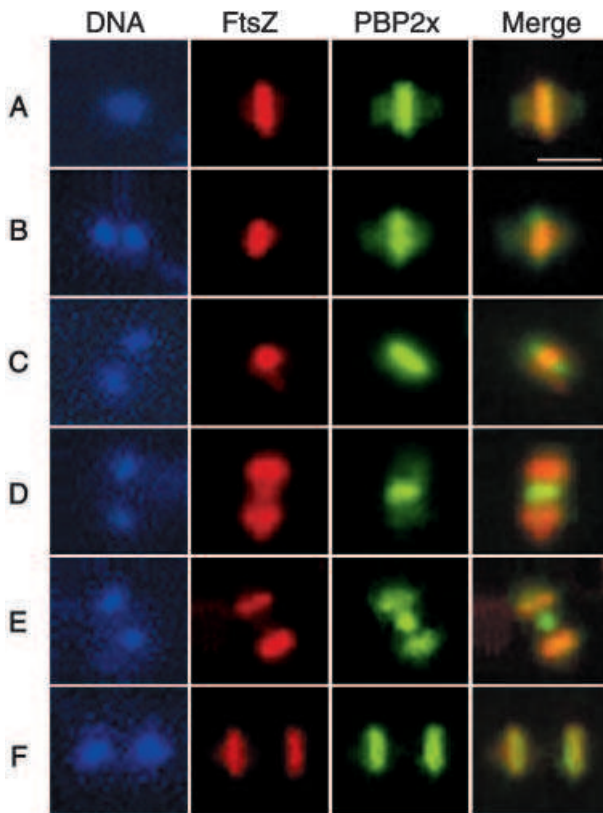
In order to carry out immunofluorescence studies, rabbit antisera were raised against the recombinantly produced extracellular domains of the five high molecular weight PBPs from *S. pneumoniae*. Antiserum against recombinant pneumococcal FtsZ was raised in mice to allow double immunolabelling of FtsZ and the PBPs. All antibodies were affinity purified against their respective target. No cross-reactivity was observed by immunoblotting. The immunolabelling procedure was performed on each batch of fixed cells without primary antibodies to insure the absence of signal from the secondary antibodies.

The PBP and FtsZ double immunolabelling, and the staining of DNA, revealed a number of identifiable patterns. These patterns could be sorted into a single logical order that seemed to reflect the progression of the bacteria through the cell cycle, particularly regarding the degree of nucleoid segregation and FtsZ-ring constriction. The generation time during the exponential phase of growth for the R6 strain used in these studies was 35 min. As cells were not synchronized, and assuming that all cells were viable and undergoing growth and division, the relative number of cells assigned to different stages of the cell cycle should be related to the respective duration of these stages. This calculation was possible only with the parental strain, as every cell displayed a well-defined pat-



**Fig. 1.** Scheme of the cell wall organization in streptococci. A. The cell is football-shaped and is surrounded by an equatorial ring formed by an outgrowth of cell wall. B. As the cell grows and divides, new cell wall (black area) is found between duplicated equatorial rings. The septal cell wall grows centripetally at mid cell, in a plane perpendicular to the long axis of the cell.

## Septal localization of PBP2x and PBP1a



**Fig. 2.** The class B high molecular weight PBP2x displays specific septal localization patterns in wild-type cells. Cells were stained for DNA (blue), FtsZ (red) and PBP2x (green), the overlay of the red and green images shows the localization of FtsZ and PBP2x simultaneously. Fluorescence micrographs were arranged to represent the progression through the cell cycle. Note that pictures A and F show the same patterns in an isolated cell and a diplococcus. Scale bar = 1  $\mu$ m.

tern. Between 150 and 250 cells were counted, depending on the labelling. With mutant strains, clear patterns could not be identified for every cell, thus preventing meaningful counting and temporal interpretation.

**Table 1.** Relative amount (%)<sup>a</sup> of the localization patterns displayed by the high molecular weight PBPs in the R6 strain and duration of the corresponding stages of the cell cycle [into brackets (min)].

	Septal					Equatorial			Others	Number of cells
Patterns <sup>b</sup>	2A + 2F <sup>c</sup>	2B	2C	2D	2E	3A + 3D <sup>c</sup>	3B	3C		
PBP2x	42 $\pm$ 3 (15)	15 $\pm$ 2 (5)	14 $\pm$ 2 (5)	13 $\pm$ 2 (5)	15 $\pm$ 2 (5)				<1	254
PBP1a	43 $\pm$ 4 (15)	15 $\pm$ 3 (5)	14 $\pm$ 3 (5)	14 $\pm$ 3 (5)	13 $\pm$ 3 (5)				<1	176
PBP2b						71 $\pm$ 3 (26)	14 $\pm$ 2 (5)	13 $\pm$ 2 (5)	<2	240
PBP2a						69 $\pm$ 3 (25)	15 $\pm$ 3 (5)	14 $\pm$ 2 (5)	<2	194
Patterns <sup>b</sup>	4A + 4H	4B	4C	4D	4E	4A + 4H <sup>c</sup>	4F	4G		
PBP1b	28 $\pm$ 4 <sup>d</sup>	8 $\pm$ 2	7 $\pm$ 2	7 $\pm$ 2	6 $\pm$ 2	30 $\pm$ 4 <sup>d</sup>	7 $\pm$ 2	6 $\pm$ 2		154

a. The error given is the standard error on the proportion.

b. 2A to 2F, 3A to 3D, and 4A to 4H refer to the fluorescence patterns shown in Figs 2, 3 and 4 respectively.

c. The patterns 2A + 2F and 3A + 3D are identical but were classed as septal and equatorial, based on the other observed patterns.

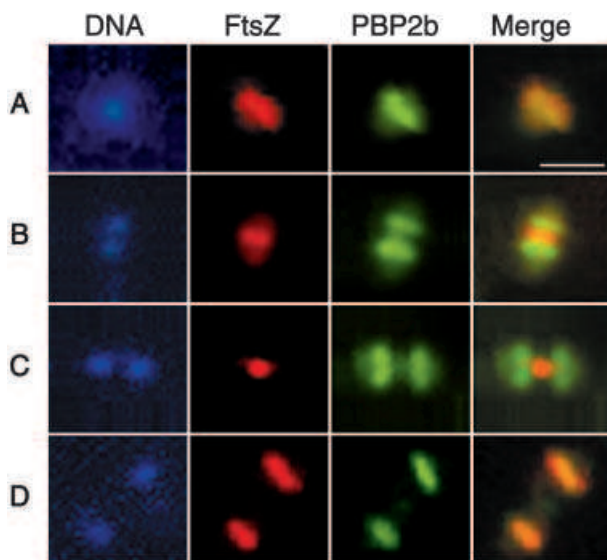
d. The collective relative amount of the 4A + 4H patterns was 58%. The values given were calculated from the relative amount of the other patterns, and applying the distribution observed for the other septal and equatorial PBPs.

the corresponding stages of the septation process is of about 5 min each or 20 min collectively. The division process thus takes slightly more than half the generation time (35 min) under our growth conditions. A delay of about 5 min can be estimated between the constriction of the FtsZ-ring and that of the distribution of PBP2x or PBP1a. Similarly, the relocation of FtsZ to the equator of the new cells occurs about 5 min before the relocation of the septal PBPs.

#### Equatorial localization of PBP2b and PBP2a

Labelling of wild-type cells for PBP2b or PBP2a, with FtsZ and the DNA, revealed only four easily differentiated patterns. The relative number of cells displaying each fluorescence pattern for PBP2b and PBP2a are given in Table 1. Figure 3A–D shows the localization of PBP2b, FtsZ and the DNA. Pictures are arranged to represent progression through the cell cycle. The calculated duration of each corresponding stage is given in Table 1. The localization of PBP2a (data not shown) was identical to that of PBP2b.

The majority of the cells, isolated or diplococci (Fig. 3A and D), showed a single central nucleoid with equatorially co-localized PBP2b and FtsZ. The next staining pattern exemplified in Fig. 3B shows two fluorescent bands of PBP2b localized across the segregated nucleoids, on both sides of the FtsZ-ring. Therefore, PBP2b and PBP2a are not septal but follow the localization of the duplicated



**Fig. 3.** The class B high molecular weight PBP2b displays equatorial localization patterns in wild-type cells. Cells were stained for DNA (blue), FtsZ (red) and PBP2b (green), the overlay of red and green images shows the localization of FtsZ and the PBP2b simultaneously. Micrographs were arranged to represent the progression through the cell cycle. Pictures A and D show the same localization pattern in an isolated cell and a diplococcus, respectively. Scale bar = 1  $\mu$ m.

equatorial rings. Figure 3C shows cells with a tightly constricted FtsZ-ring between two equatorial bands of PBP2b that have parted further, together with the nucleoids. Note that the duplication and parting of the localization of PBP2b (Fig. 3B and C) and PBP2a occur while the localization of PBP2x (Fig. 2B and C) and PBP1a remains unchanged. In Fig. 3D, FtsZ has relocated to the future division sites of the daughter cells and is co-localized again with PBP2b.

The patterns shown in Fig. 3A and D are similar to those of PBP2x in Fig. 2A and F. This similarity demonstrates the equatorial co-localization of the high molecular weight PBPs during a fraction of the cell cycle. However, the fluorescence patterns of PBP2b shown in Fig. 3A and D account for more than half the generation time, whereas the same patterns for PBP2x and PBP1a represent less than half of the cell cycle. Indeed, the equatorial localization of FtsZ indicates that the pattern exhibited in Fig. 3D also overlaps with the stages shown in Fig. 2D and E, while PBP2x and PBP1a are still present at the septum. Although the relocation of PBP2x and PBP1a during the last stages of the cell cycle allows discrimination of the patterns shown in Fig. 2D and E, the constant equatorial position of PBP2b and PBP2a reduces the number of identifiable fluorescence patterns. The only observable events are the duplication of the equatorial localization of PBP2b and PBP2a and the constriction of the FtsZ-ring.

#### PBP1b displays either septal or duplicated equatorial localization

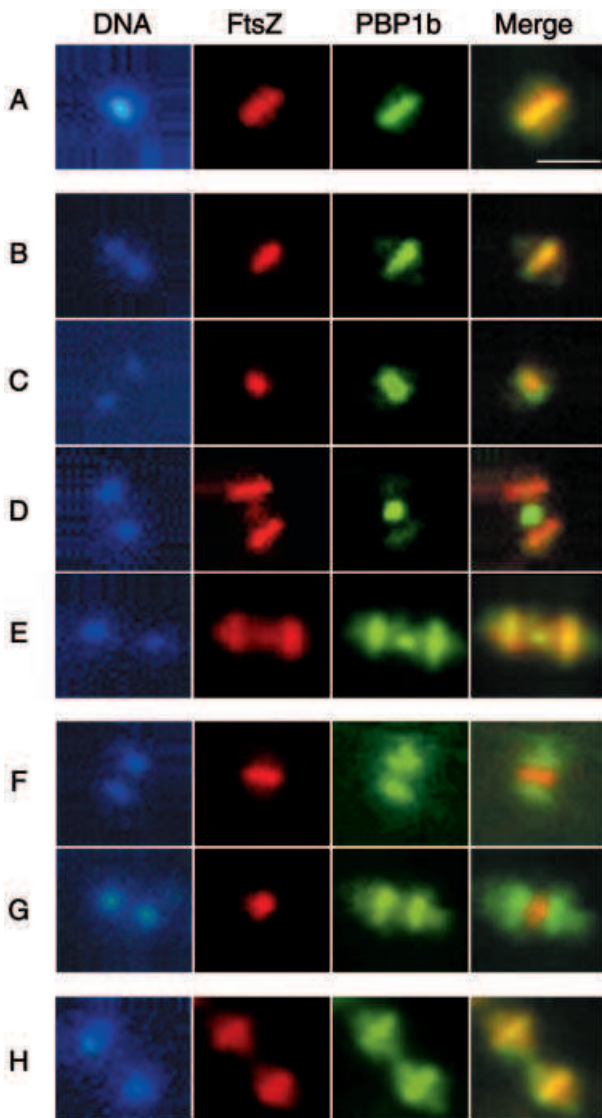
In contrast to the other high molecular weight PBPs, PBP1b was found to exhibit either septal or equatorial localization patterns (Fig. 4). About 60% of the cells showed septal PBP1b, while the remaining 40% exhibited equatorial localization (Table 1). Interestingly, the localizations appeared to be exclusive: simultaneous septal and equatorial localization of PBP1b was never observed in the same cell.

#### Localization of the high molecular weight PBPs in mutants deficient for class A PBPs

In order to understand the basis of the apparent redundancy of the class A PBPs, we used available *class A pbp* mutants (Paik *et al.*, 1999) to study the localization of the high molecular weight PBPs. These experiments showed significant modifications of the staining pattern of two of the class A PBPs, whereas the localization of the class B PBPs remained unchanged (Table 2). As expected, no staining was detected with antibodies against the proteins whose gene was disrupted.

We first examined the class A double mutants in which only one class A PBP is present. In an exponentially





**Fig. 4.** The class A high molecular weight PBP1b displays either septal or equatorial localization patterns in different cells. Cells were stained for DNA (blue), FtsZ (red) and PBP1b (green), the overlay of red and green images shows the localization of FtsZ and the PBP1b simultaneously. Micrographs were arranged to represent the progression through the cell cycle. Pictures A and H show the same localization pattern in an isolated cell and a diplococcus, respectively. B–E: septal localization; F and G: equatorial localization. Scale bar = 1  $\mu$ m.

growing population of the *pbp1b pbp1a* mutant, PBP2a was observed with a septal localization in 36% of the cells, whereas 56% of the population showed the equatorial localization of PBP2a as was observed in the parental wild-type strain.

Likewise, about 16% of the *pbp1b pbp2a* mutant cells showed an equatorial localization for PBP1a, although PBP1a was exclusively septal in the wild-type strain.

In the *pbp1b* single mutant, no significant change in the localization of the remaining high molecular weight PBPs

was observed. In contrast, in the single mutant *pbp2a*, a significant proportion of the population displayed equatorial localization of PBP1a as observed with the *pbp1bpbp2a* double mutant. Intriguingly, inactivation of the *pbp2a* gene had no effect on the localization of PBP1b as the protein partitioned between septal (61%) and equatorial (35%) behaviour in similar proportions as in the wild-type strain.

## Discussion

Double immunolabelling of the five high molecular weight PBPs and FtsZ in *S. pneumoniae* reveals new features of the growth and division mechanisms. The main contributions of the present work are as follows: (i) the division process is not carried out by a single macromolecular complex comprising all division proteins, as the centripetal migration of septal PBPs lags behind the constriction of the FtsZ-ring; (ii) the localization of non-septal PBPs at duplicated equatorial sites indicates a second site of peptidoglycan insertion and suggests a common scheme for the division of cocci and bacilli; and (iii) the genetic redundancy of some class A PBPs appears to be related to their relocation to alternative septal or equatorial structures in mutant strains.

### *Time-lag between FtsZ-ring constriction and septal cell wall synthesis*

The double immunolabelling of PBP2x or PBP1a with FtsZ provides new insights on the mechanism of bacterial division. Besides showing that PBP2x and PBP1a are the class B and class A PBPs involved in the division of *S. pneumoniae*, the data presented in Fig. 2 and Table 1 demonstrate that the division proteins do not form a macromolecular complex that persists throughout the septation process. Indeed, constriction of the FtsZ-ring precedes the shrinking of the septal localization of the PBPs by about 5 min or one seventh of the generation time. Moreover, FtsZ relocates entirely to the equator of the daughter cells while PBP2x and PBP1a are still at the septum.

The simplest explanation for the sequential conditional recruitment of the division proteins (Fts) is the gradual deposition of a macromolecular complex onto the FtsZ-ring. This putative division complex has been proposed to coordinate membrane invagination and septal cell wall synthesis. Both processes could be driven centripetally by the constriction of the FtsZ-ring. However, the new data presented here disprove this mechanism in *S. pneumoniae* by demonstrating the early uncoupling of FtsZ-driven membrane invagination and PBP-mediated peptidoglycan synthesis. Although FtsZ recruits all the division proteins to the septum, a complex consisting of all the Fts proteins

**Table 2.** Localization of the high molecular weight PBPs in class A *pbp* mutants.

Inactivated genes	Type of localization (%) <sup>a</sup>									
	PBP2x		PBP2b		PBP1a		PBP2a		PBP1b	
	Septal	Equat.	Septal	Equat.	Septal	Equat.	Septal	Equat.	Septal	Equat.
none (R6 strain)	99	<1	<2	98	99	<1	<2	98	56	43
<i>pbp1a pbp1b</i>	94	<1	<3	92			38	56		
<i>pbp1b pbp2a</i>	96	<1	<2	91	79	16				
<i>pbp1b</i>	98	<1	<3	95	97	<1	<4	91		
<i>pbp2a</i>	95	<1	<3	93	80	13			61	35

a. Only patterns of type B to E shown in Figs 2, 3B and 3C can be attributed unambiguously to a septal or an equatorial behaviour. The values given were extrapolated from the measured relative amount of these patterns to the whole population of cells, by applying the distribution of patterns observed with the septal or equatorial PBPs in the R6 strain (Table 1).

does not exist throughout the septation process. It will be of great interest to find out whether the other division proteins follow the localization of either FtsZ or PBP2x and PBP1a throughout the division process.

Our observations allow two alternative interpretations that are schematized in Fig. 5. (i) One may assume that the leading edge of the septal cell wall and that of the invaginating membrane are very close but PBP molecules remain initially localized on the whole surface of the centripetally growing septum while the FtsZ-ring constricts to a point-like structure (Fig. 5B and C, left pathway). This interpretation was proposed by Daniel and co-workers when they observed in *B. subtilis* that septal PBP2b remains localized across the whole cellular diameter while cells show clear signs of constriction (Daniel *et al.*, 2000). (ii) Alternatively, septal PBPs may be localized at the leading edge of the growing septal peptidoglycan, which lags behind membrane invagination (Fig. 5B and C, right pathway).

In support of the first interpretation was the observation that PBP2b labelling in *B. subtilis* appeared more intense as constriction proceeded (Daniel *et al.*, 2000). We favour the second interpretation in light of the following findings. First, when PBP2b from *B. subtilis* is depleted, septal cell wall synthesis is arrested while membrane invagination proceeds (Daniel *et al.*, 2000). Second, thin section electro-micrographs of *S. pneumoniae* show that the extremity of the septal cell wall does not reach the leading edge of membrane invagination in dividing cells (Tomasz *et al.*, 1964).

Several hypotheses can account for the uncoupling between septal cell wall synthesis and FtsZ-ring constriction. The trivial explanation is that both processes are completely uncoupled in *S. pneumoniae*, with recruitment of PBP2x to the septum being independent of FtsZ. Alternatively, recruitment of all the division proteins to the division site, including the PBPs, may depend on the formation of a large macromolecular complex, but subsequent modification of some component might trigger

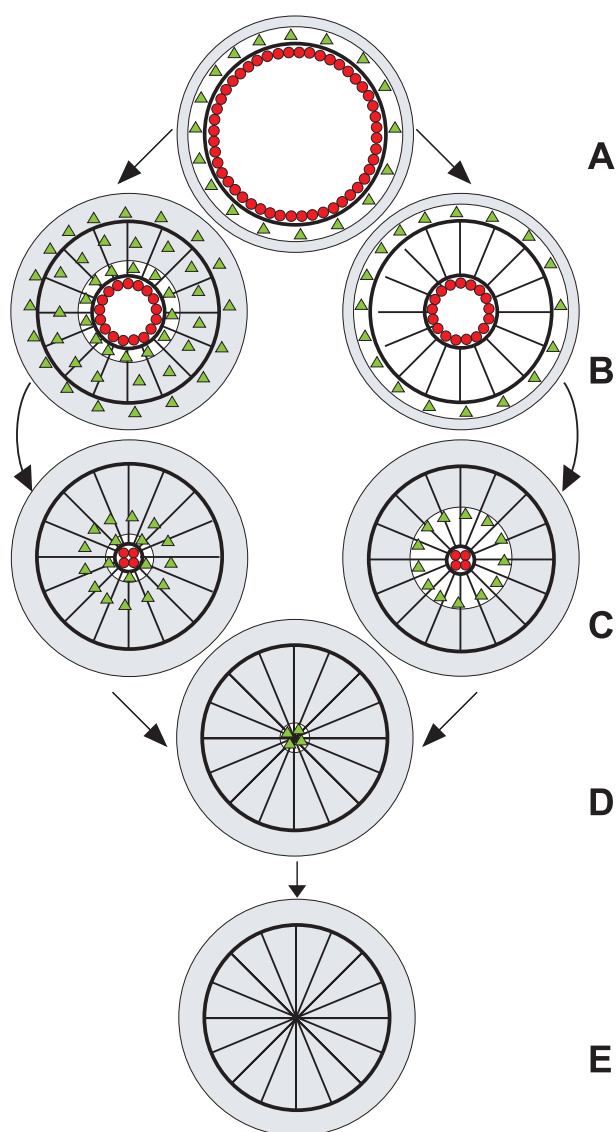
dissociation into two or more subcomplexes. Finally, recruitment of the division proteins might depend on the activity of the previously recruited proteins rather than on direct protein-protein interaction. For example, the change in membrane curvature induced by FtsZ-ring constriction may segregate proteins.

#### *Localization of the PBPs in S. pneumoniae suggests a common scheme of division for streptococci and bacilli*

PBP2x from *S. pneumoniae* was usually assumed to be the class B PBP involved in division, on the basis of the localization of its gene in a cluster devoted to cell division (Massidda *et al.*, 1998). No such argument could be applied to the class A PBPs. Our data confirm that PBP2x is a division protein and PBP1a is identified as the bifunctional PBP present at the septum. PBP1a is thus the functional homologue of PBP1 from *B. subtilis*.

Likewise, PBP2b was predicted to be the class B PBP participating in non-septal cell wall synthesis. The localizations presented in Fig. 3 and Table 1 confirm the role of PBP2b in peripheral cell wall synthesis and identify PBP2a as the non-septal class A PBP. The class A PBP1b represents a unique case. This PBP may participate in either septal and peripheral peptidoglycan synthesis since it can assume either septal or equatorial localization in different cells.

PBP2x, PBP1a, PBP2b and PBP2a are initially localized equatorially together with FtsZ. Whereas PBP2x and PBP1a remain at the middle of the dividing cell like FtsZ (Fig. 2B and C), the immunofluorescent bands of PBP2b and PBP2a are duplicated and progressively separated during the cell cycle (Fig. 3B and C). The localization of PBP2b and PBP2a matches the position of the equatorial ring identified in electron micrographs at the surface of the pneumococcal cell wall (Tomasz, 2000). This cell wall outgrowth encircling the equator of non-dividing cells duplicates into two equatorial rings as streptococci



**Fig. 5.** Alternative interpretations of the septal labelling of FtsZ (red circles) and PBP2x or PBP1a (green triangle) during the bacterial division. A front view of the septum is schematized throughout the division process with the membrane (thick circle and rays) and the peptidoglycan (light grey). In the left pathway, the membrane and peptidoglycan leading edges are juxtaposed but the PBPs remain localized on a large surface of the growing septum. In the right pathway, membrane invagination and cell wall synthesis are uncoupled as the leading edge of the septal cell wall lags behind that of the invaginated membrane. Side views of these interpretations are consistent with the localizations of the PBPs and FtsZ observed in Fig. 2.

undergo growth and division (Higgins and Shockman, 1976; Tomasz, 2000).

Early pulse-chase immunolabelling experiments of the cell wall of *S. pyogenes* by Cole and Hahn (Cole and Hahn, 1962) had shown that cell envelope synthesis is initiated equatorially. Another type of pulse-chase experiments in *S. pneumoniae* by Tomasz and colleagues also

demonstrated that new cell wall is inserted in the central portion of dividing cells (Briles and Tomasz, 1970). These studies, however, could not differentiate septal and peripheral synthesis. Based on a careful geometrical analysis of envelope synthesis in *S. faecalis*, Higgins and Shockman (1976) proposed that in addition to peptidoglycan assembly at the septum, peptidoglycan must also be inserted peripherally. Measurements of the thickness of the cell wall suggested that non-septal peptidoglycan synthesis was diffuse along the new cell wall between the duplicated equatorial rings (Higgins and Shockman, 1976). Our data on the localization of PBP2b and PBP2a indicate that peripheral peptidoglycan insertion is not diffuse, but must be restricted to the equatorial rings. Moreover, peripheral synthesis appears to precede septal synthesis by about 5 min, as the labelling pattern of PBP2x and PBP1a are unchanged (Fig. 2B) while the duplicated equatorial rings are separated (Fig. 3B).

In *E. coli*, the insertion of peptidoglycan during elongation is diffuse along the cylindrical part of the bacillus (Burman *et al.*, 1983; de Pedro *et al.*, 1997). This is in contrast with our finding in *S. pneumoniae* where non-septal peptidoglycan synthesis is finely localized. A number of published observations made in *E. coli*, suggest however, that the peripheral and septal phases of peptidoglycan assembly found in *S. pneumoniae*, also occur during the division of *E. coli*. Firstly, localized, i.e. non-diffuse, insertion of peptidoglycan at the site of division is still observed in *E. coli* in the absence of septum formation, when septal PBP3 (FtsI) is specifically inactivated (Wientjes and Nanninga, 1989). Secondly, PBP2, which participates in the elongation of *E. coli*, is also present at the site of division (Den Blaauwen *et al.*, 2003). Thus, as proposed in Fig. 6, the division of bacilli may involve two sites of peptidoglycan assembly, septal and peripheral, similar to those observed in streptococci, each carried out by specific sets of class A and class B PBPs. Bacilli differ in having an additional phase of elongation, where peptidoglycan synthesis is carried out by the same PBPs involved in peripheral division synthesis, but localized all along the elongating cylinder (Burman *et al.*, 1983; de Pedro *et al.*, 1997).

#### *The redundancy of class A PBPs results from their ability to modify their localization*

The *pbp1b* and *pbp2a* single mutants have no discernible morphological abnormalities and little or no growth defect (Paik *et al.*, 1999). In the *pbp1b* disruption mutant, all the glycosyltransferase activity required at the equatorial sites and the septum is likely to be carried out by the two remaining class A PBPs that are localized as in the parent strain. In the *pbp2a* mutant, the localization of PBP1b is not affected, as it is either septal or equatorial in the same

proportions observed in the parental strain R6. In contrast, PBP1a is observed at duplicated equatorial sites in a significant proportion of the cells. This equatorial localization of PBP1a is never observed in the parent strain. It is conceivable that the equatorial localization of PBP1a occurs only in cells where PBP1b is septal and, reciprocally, PBP1b is equatorial only when PBP1a is septal. These cells could carry out glycan strand polymerization at both sites and thus proceed normally through the cell cycle with a normal morphology. However, as the ratio of septal and equatorial localization of PBP1a and PBP1b are not inversely related, a number of *pbp2a* mutant cells must have septal localization of both PBP1a and PBP1b. These cells could possibly divide without elongation and yield non-viable minicells.

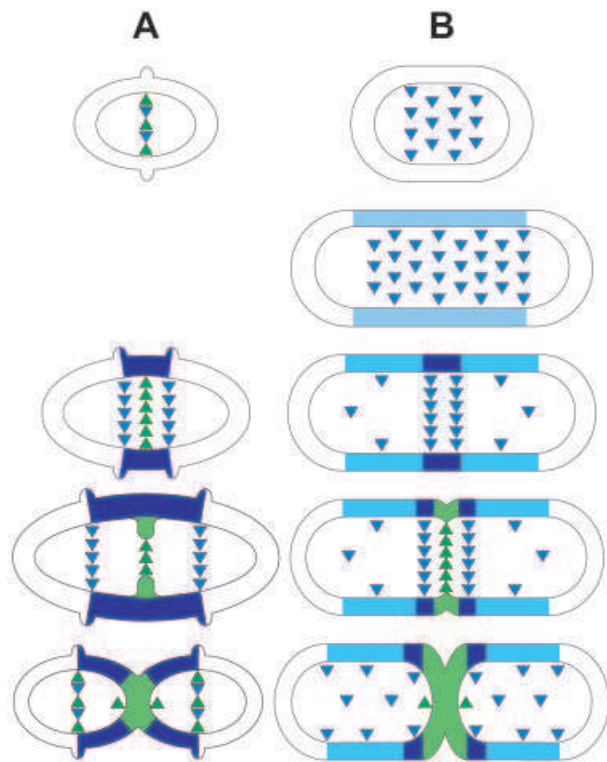
In the double mutants *pbp1b pbp1a* and *pbp1b pbp2a*, the remaining class A PBP, PBP2a and PBP1a, respectively, displays both septal and equatorial localizations, but

never simultaneously. Dividing cells have their unique class A PBP either at the septum or at the equatorial rings. Three hypotheses may explain why these strains grow with only mildly slower rates. A trivial explanation is that the unique bifunctional PBP is largely located at one of the sites, but a small, undetected amount functions also at the other site. A second model is that the only class A PBP alternates between the two sites during the cell cycle, taking part in both peripheral and septal synthesis. A third explanation (which we favour as it also accounts for the morphological defects observed in the mutants) assumes that cells undergo cell cycles with their unique bifunctional PBP located at either one of the sites. Equatorial localization and peripheral peptidoglycan synthesis without septation would produce enlarged, presumably diploid cells. On the other hand, septal synthesis in the absence of peripheral synthesis would either restore a normal size or produce mini-cells with abnormal planes of division, presumably devoid of chromosome. The double mutants *pbp1b pbp1a* and *pbp1b pbp2a* present precisely these morphological defects (Paik *et al.*, 1999).

In non-dividing cells, all the class A and class B PBPs are localized at the equator. On a finer scale, however, segregation must occur so that the appropriate PBPs become septal while the other PBPs remain equatorial, although on duplicated rings. This segregation mechanism is absent for PBP1b (which assumes either localization) and is rather weak for PBP1a and PBP2a, which can adopt an alternative localization in mutant strains. The striking aspect of this partition mechanism is its exclusivity: a given PBP cannot be both septal and equatorial in the same dividing cell. This apparent mechanism of 'decision' suggests that the localization of the class A PBPs is initiated by a nucleation event that has a given probability of occurring at either future equatorial or septal sites.

The delay of constriction of the septal PBPs after that of the FtsZ-ring, and the parting of the equatorial PBPs on each side of the division plane indicate that the high molecular weight PBPs are organized in structures that persist independently from FtsZ. One possibility is that the PBPs polymerize as autonomous rings, although no tendency to do so has been found *in vitro* and the number of molecules per cell *in vivo* might be too low. Alternatively, the PBPs may assemble onto annular scaffolds of hitherto unidentified proteins. More likely, the high molecular weight PBPs may be localized along specialized microstructures of the peptidoglycan, as suggested by the equatorial cell wall rings.

In conclusion, the simple approach of determining the localization of the high molecular weight PBPs from *S. pneumoniae* with the cell cycle markers FtsZ and the nucleoids has shed light on several issues regarding the mechanisms of bacterial growth and division. In the future, confirmation of our results may come from the use of



**Fig. 6.** The various types of peptidoglycan syntheses occurring in cocci and bacilli, and localization of the corresponding PBPs.

A. In *S. pneumoniae*, peripheral peptidoglycan synthesis (dark blue) performed by PBP2b and PBP2a (blue downward pointing triangles) precedes septal cell wall synthesis (light green) performed by PBP2x and PBP1a (green upward pointing triangles).

B. In *E. coli*, the cell is elongated by the diffuse insertion of new peptidoglycan (light blue) with PBP2 localized all along the elongating cylinder. During division, as in streptococci, peripheral (dark blue) and septal cell wall (light green) syntheses are carried out by PBP2 (blue downward pointing triangles) and PBP3 (green upward pointing triangles) respectively. The class A PBPs dedicated to each process are not identified in *E. coli*.



fusions with the green fluorescent protein. It might be particularly revealing to observe the distribution of the PBPs in live cells, although the current genetic tools to do so in *S. pneumoniae* are limited. It will also be of particular interest to extend these studies to other proteins involved in division and shape maintenance in *S. pneumoniae*, but also in bacteria with alternative morphologies such as staphylococci or spirochetes.

## Experimental procedures

### *Pneumococcal strains and cultures*

Strains are listed in Table 3. *Streptococcus pneumoniae* R6 is a non-encapsulated derivative of the Rockefeller University strain R36A. Class A PBP inactivated strains (Paik *et al.*, 1999) are insertion duplication mutants generously provided by Pr. Regine Hakenbeck (University of Kaiserslautern, Germany). All strains were grown anaerobically to an optical density of 0.4 at 600 nm at 37°C in glucose-buffered broth (Diagnostics Pasteur), before preparation for immunofluorescence microscopy. The medium was supplemented with chloramphenicol (2 µg ml<sup>-1</sup>) and/or erythromycin (1 µg ml<sup>-1</sup>), as required for the mutant strains.

### *Construction of the FtsZ expression plasmid*

The sequence encoding full length FtsZ, was amplified with the upstream primer 5'-GGATCCGAGAATCTTTATTTTCAGGCGATGACATTTTCATTTTGATACAGC-3' and the downstream primer 5'-CTCGAGTTAACGATTTTTGAAAAATGG-3'. The upstream primer introduces the coding sequence for a TEV protease cleavage site. The PCR product was inserted as a *Bam*HI-*Xho*I fragment into the plasmid pGEX-4T1 (Pharmacia) to generate pGEX-FtsZ. The insert was fully sequenced.

### *Production and purification of recombinant proteins*

Production and purification of the recombinant extracellular domain of the high molecular weight PBPs were performed as described previously (Di Guilmi *et al.*, 1998; 1999; Mouz *et al.*, 1999; Di Guilmi *et al.*, 2003).

Recombinant FtsZ was expressed in *E. coli* MC1061 as a fusion protein with the glutathione-S-transferase. Cultures in LB medium supplemented with ampicillin (100 µg ml<sup>-1</sup>) were grown at 37°C to an optical density of 1 at 600 nm. Expression was induced by addition of 0.5 mM IPTG, and further incubation for 4 h at 37°C. Harvested cells were resuspended

in 1/25th volume of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA including the Complete™ cocktail of protease inhibitor (Roche). After sonication and centrifugation, the lysate was loaded onto a 5 ml glutathione-Sepharose 4B affinity column (Pharmacia) previously equilibrated with the same buffer. The protein was eluted with 10 mM glutathione in the same buffer and dialysed against 100 volumes of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA. Cleavage of the glutathione-S-transferase was performed overnight at 37°C with 10 U of TEV protease (Invitrogen) per mg of fusion protein. The glutathione-S-transferase and uncleaved protein were retained on a glutathione-Sepharose resin. FtsZ was finally purified by gel filtration on a Superdex 200 HR 10/30 column (Pharmacia) equilibrated with the dialysis buffer.

### *Purification of antibodies against the PBPs and FtsZ*

Anti-serum against full length FtsZ was raised in mouse (Hybrisere, Grenoble, France) and antisera against PBPs were from rabbits (Elevage Scientifique des Dombes, France). Antisera were affinity purified as follows. The antisera were incubated for 2 h with purified PBP extracellular domains or full length FtsZ immobilized on activated CH Sepharose™ 4B (Pharmacia). After extensive wash with PBS, the antibodies were eluted in 300 µl fractions of 0.2 M glycine-HCl pH 2.0, immediately neutralized with 60 µl of Tris-HCl 1.5 M, pH 8.7.

### *Immunofluorescence microscopy*

Immunostaining was adapted from Harry *et al.* (1995). Briefly, cells were fixed for 15 min at room temperature and 45 min on ice in 2.5% (v/v) paraformaldehyde, 0.03% glutaraldehyde, 30 mM sodium phosphate (pH 7.5), washed three times in PBS and resuspended in 50 mM glucose, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA. Lysozyme was added to a final concentration of 0.1 mg ml<sup>-1</sup> and cells were immediately transferred onto poly L-lysine coated Poly Prep™ slides (Sigma). The slides were washed twice with PBS, air-dried, dipped in methanol at -20°C for 5 min and allowed to dry again. After rehydration with PBS, the slides were blocked for 2 h at room temperature with 2% (w/v) bovine serum albumin in PBS (BSA-PBS), and for 1 h with appropriate dilutions of anti-FtsZ and anti-PBP antibodies in BSA-PBS. The slides were then washed 10 times with PBS and incubated with a 1:100 dilution of Cy3-conjugated goat anti-mouse and Cy2-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins G (Jackson Immunoresearch) in BSA-PBS. For staining of DNA, 2 µg ml<sup>-1</sup> of 4', 6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (TEBU) was included with the secondary antibody. After

**Table 3.** *Streptococcus pneumoniae* strains.

Strain	Relevant features	Source or reference
R6	Non-encapsulated derivative of R36A	Laboratory strain
R6 <i>pbp1a</i> ::Cm <sup>r</sup> <i>pbp1b</i> ::Ery <sup>r</sup>	Deficient in PBP1a and PBP1b	Paik <i>et al.</i> , 1999
R6 <i>pbp1b</i> ::Cm <sup>r</sup> <i>pbp2a</i> ::Ery <sup>r</sup>	Deficient in PBP1b and PBP2a	Paik <i>et al.</i> , 1999
R6 <i>pbp1b</i> ::Cm <sup>r</sup>	Deficient in PBP1b	Paik <i>et al.</i> , 1999
R6 <i>pbp2a</i> ::Cm <sup>r</sup>	Deficient in PBP2a	Paik <i>et al.</i> , 1999



extensive wash with PBS, the slides were mounted using a Eukitt solution (Labonord). In controls assessing the specificity of the secondary antibodies, the incubation with the primary antibodies was omitted.

Samples were observed and photographed with a Leica DM IRB fluorescence microscope equipped with a 100× Bertrand immersion objective and standard filter sets for visualizing DAPI, Cy3 and Cy2. Images were captured with a DC350 F digital camera system (Leica) driven by the Qfluoro software package (Leica). All images were processed with Adobe Photoshop version 5.0.

## Acknowledgements

We are very grateful to Pr. R. Hakenbeck (University of Kaiserslautern) for the generous gift of the *pbp* mutant strains; to Dr I. Attree-Delic for providing access to fluorescence microscope. P. Meresse is acknowledged for production of mouse anti-FtsZ polyclonal antibodies. We thank A. M. Di Guilmi, E. Pagliero and L. Chesnel for providing purified high molecular weight PBPs. We thank Dr A. Tomasz and two anonymous reviewers for helpful comments. C.M. was supported by a CFR fellowship from CEA.

## References

- Addinall, S.G., and Holland, B. (2002) The tubulin ancestor, FtsZ, draughtsman, designer and driving force for bacterial cytokinesis. *J Mol Biol* **318**: 219–236.
- Botta, G.A., and Park, J.T. (1981) Evidence for involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation but not during cell elongation. *J Bacteriol* **145**: 333–340.
- Bramhill, D. (1997) Bacterial cell division. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 395–424.
- Briles, E.B., and Tomasz, A. (1970) Radioautographic evidence for equatorial wall growth in a gram-positive bacterium. Segregation of choline-<sup>3</sup>H-labeled teichoic acid. *J Cell Biol* **47**: 786–790.
- Buddelmeijer, N., and Beckwith, J. (2002) Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. *Curr Opin Microbiol* **5**: 553–557.
- Burman, L.G., Raichler, J., and Park, J.T. (1983) Evidence for diffuse growth of the cylindrical portion of the *Escherichia coli* murein sacculus. *J Bacteriol* **155**: 983–988.
- Cole, R.M., and Hahn, J.J. (1962) Cell wall replication in *Streptococcus pyogenes*. *Science* **135**: 722–724.
- Daniel, R.A., Harry, E.J., and Errington, J. (2000) Role of penicillin-binding protein PBP 2B in assembly and functioning of the division machinery of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **35**: 299–311.
- Den Blaauwen, T., Aarsman, M.E., Vischer, N.O., 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.
- Di Guilmi, A.M., Mouz, N., Andrieu, J.P., Hoskins, J., Jaskunas, S.R., Gagnon, J., *et al.* (1998) Identification, purification, and characterization of transpeptidase and glycosyltransferase domains of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 1a. *J Bacteriol* **180**: 5652–5659.
- Di Guilmi, A.M., Mouz, N., Martin, L., Hoskins, J., Jaskunas, S.R., Dideberg, O., and Vernet, T. (1999) Glycosyltransferase domain of penicillin-binding protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* is membrane associated. *J Bacteriol* **181**: 2773–2781.
- Di Guilmi, A.M., Dessen, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003) Functional characterization of penicillin-binding protein 1b from *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **185**: 1650–1658.
- Errington, J. (2001) Septation and chromosome segregation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* **4**: 660–666.
- Ghuysen, J.M. (1991) Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol* **45**: 37–67.
- Harry, E.J., Pogliano, K., and Losick, R. (1995) Use of immunofluorescence to visualize cell-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**: 3386–3393.
- 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.
- Hoskins, J., Matsushima, P., Mullen, D.L., Tang, J., Zhao, G., Meier, T.I., *et al.* (1999) Gene disruption studies of penicillin-binding proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **181**: 6552–6555.
- Kell, C.M., Sharma, U.K., Dowson, C.G., Town, C., Balganes, 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.
- Massidda, O., Anderluzzi, D., Friedli, L., and Feger, G. (1998) Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **144**: 3069–3078.
- Mouz, N., Di Guilmi, A.M., Gordon, E., Hakenbeck, R., Dideberg, O., and Vernet, T. (1999) Mutations in the active site of penicillin-binding protein PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*. Role in the specificity for beta-lactam antibiotics. *J Biol Chem* **274**: 19175–19180.
- Murray, T., Popham, D.L., and Setlow, P. (1998) *Bacillus subtilis* cells lacking penicillin-binding protein 1 require increased levels of divalent cations for growth. *J Bacteriol* **180**: 4555–4563.
- Nanninga, N. (1991) Cell division and peptidoglycan assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 791–795.
- 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.
- Pedersen, L.B., Angert, E.R., and Setlow, P. (1999) Septal localization of penicillin-binding protein 1 in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**: 3201–3211.
- de Pedro, M.A., Quintela, J.C., Höltje, J.V., and Schwarz, H. (1997) Murein segregation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 2823–2834.
- Tomasz, A. (2000) *Streptococcus pneumoniae*: functional

- anatomy. In *Streptococcus pneumoniae: Molecular Biology and Mechanisms of Disease*. Tomasz, A. (ed.). New York: Mary Ann Liebert, pp. 9–21.
- Tomasz, A., Jamieson, J.D., and Ottolenghi, E. (1964) The fine structure of *Diplococcus pneumoniae*. *J Cell Biol* **22**: 453–467.
- Wientjes, F.B., and Nanninga, N. (1989) Rate and topography of peptidoglycan synthesis during cell division in *Escherichia coli*: concept of a leading edge. *J Bacteriol* **171**: 3412–3419.



## **PRESENTATION DE LA PUBLICATION N°II**



## ***Présentation de la publication n° II***

Morlot, C., Noirclerc-Savoie M., Zapun, A., Dideberg, O. et Vernet, T. (2003). The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division of *S. pneumoniae*. Accepté dans *Molecular Microbiology*.

### **Objectif**

L'inactivation de la ou des PBPs de faible masse moléculaire portant une activité D,D-carboxypeptidase (D,D-CPase) entraîne une modification de la composition du peptidoglycane bactérien. Ces souches mutantes présentent également des aberrations morphologiques qui témoignent d'une désorganisation du processus de division cellulaire. Une relation de cause à effet existe certainement entre ces deux caractéristiques phénotypiques sans que l'on comprenne exactement par quel biais les D,D-CPases assureraient un déroulement correct de la division bactérienne. Les travaux décrits dans cette publication avaient donc pour but de mieux comprendre ce mécanisme au niveau cellulaire. *S. pneumoniae* ne possède qu'une seule D,D-CPase, PBP3, particularité qui facilite l'étude du rôle biologique de cette famille de protéines. Ces travaux constituaient la suite logique de l'étude du comportement cellulaire des PBPs de haute masse moléculaire décrite dans la publication n°I. Ils permettaient de compléter l'étude de la famille des PBPs chez le pneumocoque et de tenter de mettre en évidence une relation fonctionnelle entre les PBPs de haute masse moléculaire et les PBPs de faible masse moléculaire.

### **L'inactivation de la D,D-carboxypeptidase de *S. pneumoniae* entraîne un découplage du positionnement initial des PBPs de haute masse moléculaire et de l'anneau Z**

Nous avons eu dans un premier temps pour objectif de déterminer, par immunomarquage, si l'inactivation de la D,D-CPase PBP3 pouvait entraîner une modification de la localisation cellulaire des PBPs de haute masse moléculaire. La souche mutante utilisée

exprime une PBP3 active mais déletée de son hélice C-terminale amphiphile. La protéine n'est plus associée à la membrane cytoplasmique, elle est libérée dans le milieu de culture et ne peut probablement plus exercer son activité au niveau du peptidoglycane. Contrairement au type sauvage, lorsque les cellules mutantes ne sont pas encore rentrées en division, les structures annulaires formées par les PBPs de haute masse moléculaire ne co-localisent pas systématiquement avec l'anneau de FtsZ. Un tiers des cellules ces PBPs adoptent un comportement identique au type sauvage alors que les PBPs se positionnent sur un plan différent de celui de l'anneau Z dans les deux autres tiers des cellules.

### **La localisation cellulaire de FtsW dépend de FtsZ mais son comportement est identique aux PBPs impliquées dans la synthèse du septum**

FtsW est une protéine multi-transmembranaire impliquée dans la division cellulaire. Elle pourrait jouer le rôle d'une flippase catalysant la translocation du lipide II, substrat des PBPs, à travers la membrane cytoplasmique. Elle est supposée agir de concert avec la PBP de classe B impliquée dans la synthèse du septum, PBP2x chez le pneumocoque. Une interaction protéique implique que les deux partenaires co-localisent, nous avons donc cherché à vérifier si FtsW co-localisait effectivement avec PBP2x. Le double marquage de PBP2x avec FtsW a montré la co-localisation parfaite des deux protéines, à l'exception de la persistance de FtsW aux pôles de la cellule. Le double marquage de FtsZ avec FtsW a révélé un découplage temporel identique à celui observé entre FtsZ et les PBPs impliquées dans la division du pneumocoque.

Ces mêmes expériences réalisées dans la souche déficiente en activité D,D-CPase ont montré que dans les cellules qui ne sont pas encore rentrées en division, FtsW et FtsZ co-localisent alors que FtsW et PBP2x ne se localisent plus systématiquement sur le même plan. Contrairement à ce qui avait été montré par génétique pour les homologues de ces deux protéines chez *E. coli*, le recrutement de PBP2x au site de division est indépendant de FtsW chez *S. pneumoniae*. En revanche, nos résultats sont en accord avec une dépendance du recrutement de FtsW avec celui de FtsZ au site de division, comme cela a été montré pour leurs homologues chez *E. coli*.

## **La localisation cellulaire de la D,D-carboxypeptidase de *S. pneumoniae* évolue au cours du cycle cellulaire**

Notre dernier objectif a été d'étudier la localisation cellulaire de PBP3 afin de mieux comprendre sa fonction et les raisons des conséquences dramatiques de son inactivation. Tant que les cellules ne sont pas entrées en division, PBP3 présente une localisation bi-hémisphérique : elle se localise de manière diffuse sur toute la cellule excepté au niveau de son futur site de division. Par la suite, la protéine se concentre au niveau des zones riches en jeune peptidoglycane, elle ne recouvre sa localisation bi-hémisphérique qu'à la fin du cycle cellulaire. La localisation de PBP3 semble donc intimement liée à l'activité de synthèse du peptidoglycane catalysée par les PBPs de haute masse moléculaire.

### **Conclusion**

Au début du cycle cellulaire, toutes les PBPs de haute masse moléculaire, FtsZ et FtsW co-localisent au site de division, seule PBP3 présente une localisation différente. Lorsque PBP3 est inactivée, seule FtsW se localise initialement sur le même plan que FtsZ. A partir de ces observations, nous pouvons émettre l'hypothèse suivante : dans les cellules sauvages qui ne sont pas encore rentrées en division, l'absence de PBP3 au site de division permettrait d'enrichir cette zone en pentapeptides qui constituent les substrats naturels des PBPs de haute masse moléculaire. Au début du cycle cellulaire, dans la souche sauvage de pneumocoque, tout se passe donc comme si la localisation des PBPs de haute masse moléculaire était guidée par la présence de leur substrat pentapeptidique. Par la suite, PBP3 se dirigerait vers les zones riches en jeune peptidoglycane pour réguler le degré de réticulation du polymère néo-synthétisé. Lorsque PBP3 est inactivée, la présence de pentapeptides sur l'intégralité de la surface cellulaire autoriserait le positionnement des structures annulaires formées par les PBPs sur n'importe quel plan de la cellule. Ces dernières ne co-localiseraient alors plus systématiquement avec les protéines Fts. Nos résultats suggèrent également que la localisation de FtsW dépendrait effectivement de FtsZ, mais que l'activité de FtsW pourrait ensuite être potentiellement associée à celle de PBP2x puisque au cours de la division ces deux protéines co-localisent parfaitement.





**PUBLICATION N°II**



# **The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae***

**Cécile Morlot, Marjolaine Noirclerc-Savoye, André Zapun, Otto Dideberg, and Thierry Vernet\***

Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel (CEA/CNRS/UJF, UMR 5075), 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France.

- Corresponding author:

Thierry Vernet  
Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules  
Institut de Biologie Structurale  
41, rue Jules Horowitz  
38027 Grenoble Cedex 1  
Tel. : +33 4 38 78 96 81  
Fax: +33 4 38 78 54 94  
e-mail: [thierry.vernet@ibs.fr](mailto:thierry.vernet@ibs.fr)

## Summary

Bacterial division requires the coordination of the membrane invagination, driven by the constriction of the FtsZ-ring, and the concomitant cell wall synthesis, performed by the high molecular weight penicillin-binding proteins (HMW PBPs). Using immunofluorescence techniques, we show in *Streptococcus pneumoniae*, that this coordination requires PBP3, a D,D-carboxypeptidase that degrades the substrate of the HMW PBPs. In a mutant deprived of PBP3, the apparent rings of HMW PBPs and that of FtsZ, are no longer co-localized. In wild type cells, PBP3 is absent at the future division site and present over the rest of the cell surface, implying that the localization of the HMW PBPs at mid-cell depends on the availability of their substrate. FtsW, a putative translocase of the substrate of the PBPs, forms an apparent ring that is co-localized with the septal HMW PBPs throughout the cell cycle of wild type cells. In particular, the constriction of the FtsW-ring occurs after that of the FtsZ-ring, with the same delay as the constriction of the septal PBP-rings. However, in the absence of PBP3, FtsW remains co-localized with FtsZ contrary to the HMW PBPs. Our work reveals an unexpected complexity in the relationships between the division proteins. The consequences of the absence of PBP3 indicate that the peptidoglycan composition is central to the coordination of the division process.

## Introduction

Bacterial division is a complex and poorly understood process, which encompasses the segregation of chromosomes, the membrane invagination and final fusion event, and the concomitant synthesis of septal cell wall. Genetic and localization experiments conducted mainly in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* have shown that a conserved set of proteins are recruited to the site of division in the following conditional order: FtsZ, FtsA, FtsK, FtsQ, FtsL/FtsB, FtsW and FtsI (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003). These essential proteins are termed Fts as thermo-sensitive mutants of *E. coli* in the corresponding genes do not divide and adopt a filamentous phenotype at restrictive temperature. FtsZ, polymerizes at mid-cell, on the inner side of the cytoplasmic membrane, as a ring whose constriction is thought to drive membrane invagination (Addinall and Holland, 2002). FtsA binds to both FtsZ and the membrane and possibly mediates the interaction between them (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003). FtsK is a membrane protein whose cytoplasmic domain is involved in chromosome segregation (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003) and possibly in membrane fusion (Sharp and Pogliano, 1999). FtsQ, FtsL and FtsB are bitopic membrane proteins of unknown function (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003). FtsW has ten transmembrane segments (Gerard *et al.*, 2002) and has been proposed to translocate the precursor of the peptidoglycan to the extracellular side of the membrane where it is incorporated in the cell wall by several penicillin-binding proteins (PBPs), including FtsI (Matsushashi *et al.*, 1990).

Although the Fts proteins are recruited in a conditional succession, several lines of evidence indicate that a complex comprising all the division proteins does not exist throughout the septation process. Indeed, immunolocalization of FtsZ and PBP2x (FtsI) during the cell cycle of *Streptococcus pneumoniae* has shown that constriction of the FtsZ-

ring is well underway while PBP2x remains at the periphery of the septum (Morlot *et al.*, 2003). Similarly in *B. subtilis*, the localization of PBP2B was found to span the whole cell diameter whereas clear signs of membrane constriction were observed (Daniel *et al.*, 2000). These findings rise the question of how are coordinated the processes of membrane invagination and septal cell wall formation.

D,D-carboxypeptidases are not essential and have not been hitherto considered as major participants of the division mechanism, although a mutant of *S. pneumoniae* (*dacA*) deficient in its single D,D-carboxypeptidase PBP3 exhibits defects in division with multiple septa initiated at aberrant locations (Schuster *et al.*, 1990). Similarly, the *dacA* mutant of *E. coli* deficient in PBP5 has an abnormal morphology (Nelson and Young, 2000, 2001). We demonstrate here that the D,D-carboxypeptidase PBP3 is central to the organization of the division process in *S. pneumoniae*.

D,D-carboxypeptidases are low molecular weight PBPs. In contrast to the high molecular weight (HMW) PBPs that synthesize the cell wall peptidoglycan, the D,D-carboxypeptidases are thought to regulate its degree of cross-linking. The peptidoglycan consists of disaccharide chains that are cross-linked by peptide bridges. These bridges are formed by a transpeptidation reaction between a primary amine from an acceptor stem-peptide attached to one glycan chain, and a donor stem-pentapeptide attached to an adjacent chain, with the departure of the last residue of the pentapeptide. Trimming of the last residue of the pentapeptides by D,D-carboxypeptidases reduces the availability of donors for the transpeptidation reaction and thus limits the reticulation of the peptidoglycan.

To investigate the role of PBP3 in the growth and division of *S. pneumoniae*, the localization of FtsZ, FtsW and the HMW PBPs was determined in a wild type and a *dacA* mutant strain, using various combinations of double immunolabeling. In the PBP3 deficient

cells that are not engaged in division, we show that the rings formed by FtsZ and FtsW are spatially dissociated from the rings formed by the HMW PBPs, including PBP2x (FtsI).

The localization of PBP3 in a wild type strain of *S. pneumoniae* suggests that it exerts its role in division not through direct protein-protein interaction, but probably through its enzymatic activity, which modifies the composition of the peptidoglycan.



## Results

### *Localization of the high molecular weight PBPs in a PBP3 deficient strain*

In a previous work, we have studied the localization of all the HMW PBPs and FtsZ during the cell cycle of a wild type strain of *S. pneumoniae*. The reported phenotype of the *dacA* mutant, which shows severe disorders in septa formation and a thickened cell wall (Schuster *et al.*, 1990), prompted us to study the localization of the HMW PBPs and FtsZ in this strain. The *dacA* mutant expresses a PBP3 variant without its 51 C-terminal residues, which include the membrane anchor. The truncated PBP3 of this mutant is therefore secreted in the medium. No PBP3 can be detected in whole cell preparations (Schuster *et al.*, 1990), and we could not detect any by immunofluorescence (data not shown).

Immunofluorescence pictures were obtained with rabbit antisera against the PBPs together with a mouse antiserum against FtsZ. Data were more difficult to obtain with the *dacA* mutant than with the wild type strain, particularly regarding staining of the PBPs. The thick cell wall of this mutant may impair fixation or staining, or the localization of the PBPs may be more diffuse. Thus, less than 60% of the mutant cells displayed defined staining patterns for the different PBPs. Nearly all cells with a clear localization of the PBPs had a single nucleoid. Among those, about 30 % displayed the typical localization found with the wild type strain, whereas 70 % exhibited unexpected fluorescence patterns.

The patterns observed with the *dacA* mutant stained for DNA, FtsZ and PBP2x are shown in Figure 1. These patterns are representative of the immunolabeling observed with the other four HMW PBPs (PBP2b, PBP1a, PBP2a, PBP1b, data not shown). Some cells displayed perfect superposition of FtsZ and PBP2x (Figure 1A) as observed with the wild type strain (Morlot *et al.*, 2003). In other cells, FtsZ and PBP2x appeared as superimposed circles or ellipses (Figure 1B), which had not been observed with wild type pneumococci.

Whereas wild type cells are football-shaped and always lie along their long axis, Gram staining (not shown) and electron micrographs (Schuster *et al.*, 1990) have showed that *dacA* mutant cells are more spherical. With this rounded morphology, cells can lie on the slide randomly, including in orientations that allow a frontal view of the septal rings of FtsZ and PBPs. Unfortunately, this opportunity to view the septum frontally concerns only isolated cells with a single nucleoid, as they become elongated as division proceeds.

Most interestingly, some mutant cells displayed a circle of FtsZ crossed by a band of PBP2x and *vice versa* (Figures 1C and 1D). Other cells showed crossed bands of FtsZ and PBP2x (Figure 1E). These patterns, also observed with the other HMW PBPs (not shown), indicate that their annular localization does not depend on the FtsZ-ring in the absence of PBP3.

We could not identify unexpected localization for stages of the cell cycle where division is underway. Therefore it was impossible to determine if cells, which do not display initial co-localizations of FtsZ and the PBPs (Figures 1C to 1E), are able to divide.

#### *Localization of FtsW in wild type and dacA mutant strains*

We have shown previously that septal PBPs (PBP2x and PBP1a) are not co-localized with FtsZ throughout the division process. Instead, constriction of the FtsZ-ring precedes that of PBP2x and PBP1a by about 5 min, when cells are growing with a generation time of 35 min.

Several lines of evidence points to a close functional relationship between the class B PBPs, which include PBP2x and the family of protein that includes FtsW. Firstly, in *E. coli* and *B. subtilis*, the localization of the septal class B PBP depends on FtsW (Mercer and Weiss, 2002). Second, *E. coli* cells deficient in PBP2 or RodA (its cognate FtsW-like protein) have the same phenotype (Asoh *et al.*, 1983). Thirdly, in each complete bacterial genome, there are an equivalent number of genes encoding class B PBPs and FtsW-like proteins, with

their respective genes often grouped in operons. These considerations prompted us to investigate if the localizations of FtsW and the septal PBPs are identical.

Mouse and rabbit antisera were raised against FtsW and FtsZ respectively to allow double immunolabeling. Figure 2 shows the localization of FtsW and FtsZ during the cell cycle of a wild type strain. As every cell displayed one of the represented patterns (Fig. 2), and assuming that all cells are undergoing growth and division, the relative number of cells displaying each pattern is directly proportional to the duration of the corresponding stage of the cell cycle (Morlot *et al.*, 2003) (Table 1). A delay of about 5 min is observed between the onset of the FtsZ-ring constriction and the apparent diminution of the distribution of FtsW (Figure 2C), with cells growing with a generation time of 35 min. Near the end of the division process, FtsZ is already re-localized to the equator of the daughter cells whereas FtsW remains at the septum (Figure 2D). FtsW even appears to persist at the poles (Figures 2A to 2C). Thus, the localization of FtsW during the cell cycle appears to be identical to that of PBP2x and PBP1a, with the exception of the persistence of a polar localization in some cells. This was confirmed by the double immunolabeling of FtsW and PBP2x, which shows the co-localization of the two proteins at the septum in every cell (Figure 3) and some additional polar distribution of FtsW (Figures 3A, 3D and 3E).

In the *dacA* mutant, the annular distribution of FtsW could be observed in some cells due to their spherical shape. In contrast to the PBPs, FtsW appears to be always co-localized with FtsZ (Figure 4), except for the delay of the constriction of the annular distribution. Thus, the deficiency in PBP3 does not result in a spatial dissociation of the FtsW- and FtsZ-rings. Consistently, in the absence of PBP3, the annular localizations of PBP2x and FtsW are uncoupled in cells that are not undergoing division. Indeed, in the *dacA* mutant, the double immunolabeling of PBP2x and FtsW (Figure 5) shows fluorescent patterns similar to those observed with the labeling of the PBPs and FtsZ (Figure 1). Note that the size of the observed

rings, ellipses or bands varies, which reflects the irregular size and morphology of the *dacA* mutant cells (9).

### *Localization of the D,D-carboxypeptidase PBP3*

Considering the dramatic consequences of the absence of PBP3, we determined its localization in wild type cells to better understand its function. In isolated cells or diplococci with a single central nucleoid and an equatorially localized FtsZ-ring (Figures 6A and 6D), PBP3 labeling was found to be evenly distributed on both hemispheres, but absent at the equator, site of the future division. Thus, the localization of PBP3 in non-dividing cells appears to be reversed that of the HMW PBPs (Morlot *et al.*, 2003).

In the next staining pattern (Figure 6B), PBP3 immunofluorescence appears lighter on the old hemispheres of the dividing bacteria, whereas it is brighter in a central zone. The greater labeling of PBP3 between the parting old hemispheres is even more visible in cells with a constricted FtsZ-ring, which appears as a dot between the nucleoids (Figure 6C).

As for the labeling of the HMW PBPs and FtsW, the relative number of the various observed patterns could be translated into the duration of the corresponding stages of the cell cycles. Values are given in Table 1.

## Discussion

### *The D,D-carboxypeptidase PBP3 is a major determinant of the division site*

The localization of the various HMW PBPs, FtsZ and FtsW during the cell cycle is represented in Figure 7, according to the observations presented in this and a precedent study (Morlot *et al.*, 2003). It is assumed that the new peptidoglycan is the product of the observed PBPs.

Our main observation is the spatial dissociation of the rings formed by FtsZ and FtsW from those formed by the HMW PBPs, in a strain deficient in PBP3 (Figures 1 and 5). Thus, the D,D-carboxypeptidase PBP3 plays a major role in organizing the growth and division processes. This finding adds to the growing evidence that the D,D-carboxypeptidases are key elements of the bacterial morphogenetic apparatus (Young, 2003).

HMW PBPs catalyze the synthesis of the peptidoglycan. Stem peptides attached to the disaccharide units of the glycan chain are cross-linked by a transpeptidation reaction. In *S. pneumoniae*, the major donor stem-peptide is the L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala pentapeptide, which loses its terminal D-Ala residue while forming a new peptide bond with the amine of the lysine of an acceptor stem-peptide (Severin and Tomasz, 2000). Presence of PBP3 on the surface of both hemispheres of wild type cells (Figures 6A and 6D) insures that no donor stem-peptides are available for transpeptidation in these normally inert regions of the cell envelope. Inversely, the absence of PBP3 at the equator (Figures 6A and 6D) insures that it is the only place where donor pentapeptides are available for transpeptidation. The localization of the HMW PBPs would thus be mediated by the availability of substrate for their transpeptidase activity. Indeed, the non-overlapping distribution of PBP3 and the HMW PBPs rules out a direct interaction between these proteins. Also, the *dacA* mutant in *E. coli* can be complemented by another low molecular weight PBP with an active site modified to

mimic that of the product of *dacA* (Ghosh and Young, 2003). This result demonstrates that the enzymatic activity encoded by *dacA*, rather than the protein supporting this activity, that is crucial for its cellular function (Ghosh and Young, 2003; Nelson *et al.*, 2002).

The mechanism of exclusion of PBP3 from the equator remains to be investigated. PBP3 is anchored to the cell surface by a C-terminal amphipathic helix that lies on the plasma membrane. It is therefore possible that the local lipid composition of the membrane influences the localization of PBP3. Cardiolipin, for example, has been shown to be concentrated at the site of division in *E. coli* (Mileykovskaya *et al.*, 1998). Another intriguing possibility is that FtsK plays a role in the exclusion of PBP3 at mid cell. Two different point mutations in the N-terminal, membrane-imbedded portion of FtsK cause a late block of the division of *E. coli*, which is suppressed by the deletion of *dacA* (Begg *et al.*, 1995; Draper *et al.*, 1998). It is conceivable that in these *fisK* mutants, the *dacA* gene product is not excluded from the division site and that degradation of the pentapeptide at mid cell prevents completion of the division.

Interestingly, once growth and division are underway, PBP3 appears to be more concentrated in the central zone, the region of young cell wall (Figures 6B and 6C). This young peptidoglycan presumably presents a greater concentration of pentapeptides to be trimmed, in order to mature into inert hemispheres. Then the greater concentration of PBP3 in the young region of the cell surface may simply result from the affinity for its substrate.

#### *HMW PBPs can form autonomous ring-like structures*

A second unexpected conclusion stems from the non co-localization of the rings of HMW PBPs and of Fts proteins in the *dacA* mutant. The HMW PBPs can exhibit a ring-like distribution independently from the FtsZ-ring scaffold or other conspicuous annular structure of the cell wall. Two possibilities can account for the formation of these rings of HMW

PBPs. They may have an intrinsic propensity to assemble as rings surrounding the plasma membrane, following a nucleation event that can occur anywhere on the cell surface in the absence of PBP3, or only at the equator in its presence. Alternatively, rings of HMW PBPs may assemble on the FtsZ-ring scaffold, but later drift around the cell in the absence of PBP3, or be retained at the equator in its presence.

Three considerations suggest that in the absence of PBP3 the rings of HMW PBPs can move around the cell. Firstly, in the *dacA* mutant, the great thickness of the cell wall and the aborted septa may result from the activity of the PBP rings as they skim the cell surface. Secondly, some cells show multiple incomplete septa, whereas we observe single rings of PBP2x and PBP1a, indicating that the rings can move. Thirdly, the mild effect of the *dacA* mutation on the growth rate, and the great proportion of cells displaying non co-localized rings of FtsZ and HMW PBPs (70%), suggest that the latter are viable and may divide if the various rings can drift and eventually adopt a relative orientation that is compatible with the division process (Figure 7B).

How is maintained the annular distribution of the PBPs in the absence of known supporting structure? The simplest explanation is that membrane bound PBPs polymerize around the cell. Dividing the perimeter of the cell by the size of the PBPs shows that about 500 molecules are required to surround the cell once. Small numbers of molecules per cell have been reported for the PBPs from *E. coli* and *Staphylococcus aureus* (Dougherty *et al.*, 1996; Pucci and Dougherty, 2002). These numbers of molecules fall short of allowing a contiguous polymer of PBP around the cell. Moreover, no tendency to aggregate has been noticed for the various recombinant extra-cytoplasmic domains of class B PBPs that have been purified. Also, in the various crystal structure of PBP2x that were obtained, the crystallographic contacts differ, arguing against a favored mechanism of auto-association. The alternative explanation to the auto-association of the PBPs is their assembly on a scaffold

formed by other unidentified proteins or along a special feature of the peptidoglycan that is not visible to our means of investigations. For example, the cell wall outgrowth that marks the equator of wild type cells may persist in some form in the *dacA* mutant strain, although it is not visible on the available electron micrographs (Schuster *et al.*, 1990).

### *FtsW does not form a stable complex with either FtsZ or the septal PBPs*

The genetic and functional relationship between FtsW-like proteins and class B HMW PBPs led to the long held, but still unproven, hypothesis that FtsW-like proteins are flippases, which transfer the peptidoglycan precursor from the cytoplasm to the periplasm for use by the PBPs (Matsuhashi *et al.*, 1990). It was therefore of interest to check if FtsW were associated with the septal PBPs.

Indeed, in wild type cells, FtsW is co-localized with PBP2x, showing the same delay of constriction after that of the FtsZ-ring. This finding is consistent with a functional partnership between FtsW and septal PBPs. This observation also indicates that FtsW does not belong to a complex comprising FtsZ throughout the division process, although FtsW depends on FtsZ proteins for its septal localization in *E. coli* and *B. subtilis* (Buddelmeijer and Beckwith, 2002; Errington *et al.*, 2003).

Against our expectations, in PBP3 deficient cells that are not engaged in division, FtsW was found to co-localize with FtsZ but not always with PBP2x. Thus, FtsW does not form an obligatory complex with septal PBPs. However, in *dacA* mutant cells that are undergoing division, constriction of the FtsW-ring is indistinguishable from that of PBP2x. That is, constriction of the FtsW- and PBP2x-rings occurs later than constriction of the FtsZ-ring. Therefore, we must conclude that, unlike the HMW PBPs, the localization at mid cell of FtsW is independent of PBP3, but that constriction of the FtsW-ring is somehow linked to the synthesis of the septal cell wall by the HMW PBPs (Figure 7B).



The present work has revealed a hitherto hidden complexity in the relationships between the division proteins. Although numerous studies in *E. coli* and *B. subtilis* have determined the localization of the different division proteins in various genetic backgrounds, few works have investigated two or more proteins simultaneously. We think that such multi-protein investigations, carried out in different types of bacteria will provide a more detailed picture of the fundamental processes of bacterial growth and division.

## Experimental procedures

### *Pneumococcal strains and cultures*

*S. pneumoniae* R6 is a nonencapsulated derivative of the Rockefeller University strain R36A. PBP3 inactivated strain (Schuster *et al.*, 1990) is an insertion duplication mutant generously provided by Pr. Regine Hakenbeck (University of Kaiserslautern, Germany). Strains were grown anaerobically to an optical density of 0.4 at 600 nm at 37°C in glucose buffered broth (Diagnostics Pasteur), prior to preparation for immunofluorescence microscopy.

### *Plasmids, proteins, antibodies and immunofluorescence microscopy*

The sequence encoding a truncated form of PBP3 (Gly15 to Lys394) was amplified by PCR using the primers

5'CGGGATCCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCGGGGGTGTTCCTACTGCTG3' and

5'GGCTCGAGTCATTTTCAATTTTCTTG3' and inserted as a *Bam*HI-*Xho*I fragment into the plasmid pGEX-4T1 (Pharmacia) to generate pGEX-sPBP3\*.

The high molecular weight PBPs, FtsZ and FtsW were produced and purified as described previously (Di Guilmi *et al.*, 1998; Di Guilmi *et al.*, 1999; Di Guilmi *et al.*, 2003; Morlot *et al.*, 2003; Mouz *et al.*, 1999; Noirclerc-Savoy *et al.*, 2003).

PBP3 was expressed in *E. coli* MC1061 as a fusion protein with the glutathione-S-transferase and a TEV protease cleavage site. Expression induced with 0.5 mM IPTG was overnight at 16°C. After sonication in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, the lysate was loaded onto a 5-ml glutathione-Sepharose 4B affinity column (Pharmacia) equilibrated with the same buffer. PBP3 was eluted with 10 mM glutathione and dialysed against 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA. Cleavage of the glutathione-S-transferase was performed overnight at 37 °C with 10 U of TEV protease (Invitrogen) per mg

of protein. After retention of the glutathione-S-transferase on a glutathione-Sepharose resin, PBP3 was further submitted to ion exchange chromatography on a ResourceQ resin (Pharmacia) equilibrated in the same buffer and eluted with a NaCl gradient. Homogeneity was finally achieved by gel filtration on a Superdex 200 HR (Pharmacia) equilibrated with the dialysis buffer.

Anti-sera raised in mouse (Hybrisere, Grenoble, France) or rabbits (Elevage Scientifique des Dombes, France) were affinity purified as described previously (Morlot *et al.*, 2003). Immuno-stainings were performed and analyzed as described previously (Harry *et al.*, 1995; Morlot *et al.*, 2003).

## Acknowledgements

We are very grateful to Pr. R. Hakenbeck (University of Kaiserslautern) for the generous gift of the *dacA* mutant strain. We thank Dr I. Attree-Delic for providing access to fluorescence microscope. P. Meresse (HybrIsère) is acknowledged for production of mouse anti antisera. We thank A.M. Di Guilmi, E. Pagliero and L. Chesnel for providing purified high molecular weight PBPs. C. M. was supported by a CFR fellowship, and M. N.-S. by a post-doctoral fellowship, both from CEA.

## References

- Addinall, S.G., and Holland, B. (2002) The tubulin ancestor, FtsZ, draughtsman, designer and driving force for bacterial cytokinesis. *J. Mol. Biol.* **318**: 219-236.
- Asoh, S., Matsuzawa, H., Matsushashi, M., and Ohta, T. (1983) Molecular cloning and characterization of the genes (*pbpA* and *rodA*) responsible for the rod shape of *Escherichia coli* K-12: analysis of gene expression with transposon Tn5 mutagenesis and protein synthesis directed by constructed plasmids. *J. Bacteriol.* **154**: 10-16.
- Begg, K.J., Dewar, S.J., and Donachie, W.D. (1995) A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*. *J. Bacteriol.* **177**: 6211-6222.
- Buddelmeijer, N., and Beckwith, J. (2002) Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 553-557.
- Daniel, R.A., Harry, E.J., and Errington, J. (2000) Role of penicillin-binding protein PBP 2B in assembly and functioning of the division machinery of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **35**: 299-311.
- Di Guilmi, A.M., Mouz, N., Andrieu, J.P., Hoskins, J., Jaskunas, S.R., Gagnon, J., Dideberg, O., and Vernet, T. (1998) Identification, purification, and characterization of transpeptidase and glycosyltransferase domains of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 1a. *J. Bacteriol.* **180**: 5652-5659.
- Di Guilmi, A.M., Mouz, N., Martin, L., Hoskins, J., Jaskunas, S.R., Dideberg, O., and Vernet, T. (1999) Glycosyltransferase domain of penicillin-binding protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* is membrane associated. *J. Bacteriol.* **181**: 2773-2781.
- Di Guilmi, A.M., Dessen, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003) Functional Characterization of Penicillin-Binding Protein 1b from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **185**: 1650-1658.

- Dougherty, T.J., Kennedy, K., Kessler, R.E., and Pucci, M.J. (1996) Direct quantitation of the number of individual penicillin-binding proteins per cell in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 6110-6115.
- 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.
- Errington, J., Daniel, R.A., and Scheffers, D.J. (2003) Cytokinesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 52-65.
- Gerard, P., Vernet, T., and Zapun, A. (2002) Membrane topology of the *Streptococcus pneumoniae* FtsW division protein. *J. Bacteriol.* **184**: 1925-1931.
- Ghosh, A.S., and Young, K.D. (2003) Sequences near the active site in chimeric penicillin binding proteins 5 and 6 affect uniform morphology of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**: 2178-2186.
- Harry, E.J., Pogliano, K., and Losick, R. (1995) Use of immunofluorescence to visualize cell-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**: 3386-3393.
- Matsushashi, M., Wachi, M., and Ishino, F. (1990) Machinery for cell growth and division: penicillin-binding proteins and other proteins. *Res. Microbiol.* **141**: 89-103.
- Mercer, K.L., and Weiss, D.S. (2002) The *Escherichia coli* cell division protein FtsW is required to recruit its cognate transpeptidase, FtsI (PBP3), to the division site. *J. Bacteriol.* **184**: 904-912.
- Mileykovskaya, E., Sun, Q., Margolin, W., and Dowhan, W. (1998) Localization and function of early cell division proteins in filamentous *Escherichia coli* cells lacking phosphatidylethanolamine. *J. Bacteriol.* **180**: 4252-4257.

- 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.
- Mouz, N., Di Guilmi, A.M., Gordon, E., Hakenbeck, R., Dideberg, O., and Vernet, T. (1999) Mutations in the active site of penicillin-binding protein PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*. Role in the specificity for beta-lactam antibiotics. *J. Biol. Chem.* **274**: 19175-19180.
- Nelson, D.E., and Young, K.D. (2000) Penicillin binding protein 5 affects cell diameter, contour, and morphology of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**: 1714-1721.
- Nelson, D.E., and Young, K.D. (2001) Contributions of PBP 5 and DD-carboxypeptidase penicillin binding proteins to maintenance of cell shape in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 3055-3064.
- Nelson, D.E., Ghosh, A.S., Paulson, A.L., and Young, K.D. (2002) Contribution of membrane-binding and enzymatic domains of penicillin binding protein 5 to maintenance of uniform cellular morphology of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**: 3630-3639.
- Noirclerc-Savoy, M., Morlot, C., Gerard, P., Vernet, T., and Zapun, A. (2003) Expression and purification of FtsW and RodA from *Streptococcus pneumoniae*, two membrane proteins involved in cell division and cell growth, respectively. *Protein Expr Purif* **30**: 18-25.
- Pucci, M.J., and Dougherty, T.J. (2002) Direct quantitation of the numbers of individual penicillin-binding proteins per cell in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **184**: 588-591.

- 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.
- Severin, A., and Tomasz, A. (2000) The peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae*. In *Streptococcus pneumoniae, Molecular Biology and Mechanisms of Disease*. Tomasz, A. (ed). Larchmont, NY: Mary Ann Liebert, Inc., pp. 179-195.
- Sharp, M.D., and Pogliano, K. (1999) An in vivo membrane fusion assay implicates SpoIIIE in the final stages of engulfment during *Bacillus subtilis* sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14553-14558.
- Young, K.D. (2003) Bacterial shape. *Mol. Microbiol.* **49**: 571-580.



## Legends

**Fig. 1.** Immunolocalization of PBP2x (green) and FtsZ (red) in *dacA* mutant cells. DAPI-stained DNA is in blue. The overlay of the red and green images shows the localization of FtsZ and PBP2x simultaneously (merge). Deficiency in PBP3 results in spherical cells that can lie on the slide in all orientations, allowing frontal views of cellular rings. (A and B) Cells showing co-localized FtsZ- and PBP2x rings in side and front views respectively. (C and D) Cells allowing simultaneous front and side views of either FtsZ or PBP2x rings that are not co-localized. (E) Cells allowing side views of FtsZ or PBP2x rings that are not co-localized. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 2.** Immunolocalization of FtsW (red) and FtsZ (green) in wild type cells. DAPI-stained DNA is in blue. Fluorescence micrographs were arranged to represent the progression through the cell cycle. The overlay of the red and green images shows the localization of FtsZ and FtsW simultaneously (merge). Pictures A and F show the same pattern with a single nucleoid, in an isolated cell and a diplococcus. Between segregated nucleoids, FtsZ-ring exhibits a more advanced constriction than the distribution of FtsW (B and C). Relocalization of FtsZ to the future division site of the daughter cells precedes that of FtsW (D and E). Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 3.** Immunolocalization of FtsW (red) and PBP2x (green) in wild type cells. DAPI-stained DNA is in blue. Fluorescence micrographs were arranged to represent the progression through the cell cycle. The overlay of the red and green images shows the localization of FtsW and PBP2x simultaneously (merge). Pictures A and E show the same pattern with a single nucleoid, in an isolated cell and a diplococcus. The constriction of the distribution of FtsW and PBP2x between segregated nucleoids (B and C), and their subsequent relocalization to the future division site of the daughter cells (D) are synchronized. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 4.** Immunolocalization of FtsW (red) and FtsZ (green) in *dacA* mutant cells. DAPI-stained DNA is in blue. The overlay of the red and green images shows the localization of FtsZ and FtsW simultaneously (merge). FtsW and FtsZ are always co-localized in cells showing a single nucleoid. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 5.** Immunolocalization of FtsW (red) and PBP2x (green) in *dacA* mutant cells. DAPI-stained DNA is in blue. (A and B) Cells showing co-localized FtsW- and PBP2x-rings in side and front views respectively. (C and D) Cells allowing simultaneous front and side views of either FtsW- or PBP2x-rings that are not co-localized. (E) Cells allowing side views of FtsW- or PBP2x-rings that are not co-localized. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 6.** Localization of the D,D-carboxypeptidase PBP3 through the cell cycle. Shown are the DNA staining (blue), the immunodetection of FtsZ (red) and PBP3 (green), and an overlay of the FtsZ and PBP3 labeling (merge). Pictures A and E were considered to represent a single pattern, in isolated cells, and diplococci, respectively. The arrows indicate zones presumably devoid of PBP3 appearing as a shadow at the equator of non-dividing cells. Scale bar = 1  $\mu\text{m}$ . The last column presents an interpretation of the fluorescence data. The old peptidoglycan is light blue, the new peptidoglycan is dark blue and dark green. The FtsZ-ring is in red and PBP3 is depicted by light green dots. The density of PBP3 on the cell surface is greater in areas of new peptidoglycan.

**Fig. 7.** Localization of the HMW PBPs, FtsZ and FtsW during the cell cycle of wild type (A) and *dacA* mutant *S. pneumoniae*. The old peptidoglycan is light blue, the new peripheral peptidoglycan is dark blue and the septal peptidoglycan is dark green. The distribution of PBP2x and PBP1a is light green, that of PBP2b and PBP2a is blue, FtsZ is in black and FtsW is in red. Peripheral peptidoglycan synthesis is performed by PBP2b and PBP2a, which are both found in duplicated rings that are driven apart by the new peptidoglycan. Synthesis of septal peptidoglycan is performed by constricting rings of PBP2x and PBP1a. Note that

constriction of the FtsZ-ring precedes that of FtsW and the septal PBPs, which relocalize to the future division sites after FtsZ. In non-dividing *dacA* mutant cells, the rings of PBPs are not always colocalized with that of FtsZ and FtsW. During division, the distribution of the proteins in the mutant is like in the wild type. We propose that the PBP-rings can move relative to the FtsZ-ring, and that division starts when the various rings are sufficiently aligned.

**Table 1.** Relative amount (%) of the localization patterns displayed by the different combinations of Fts and PBPs in the wild type strain and duration of the corresponding stages of the cell cycle (in to brackets (min)).

Double labelling	Patterns <sup>a</sup>						Number of cells
FtsZ	2A+2F	2B	2C	2D	2E	Others	298
FtsW	41±3 (15)	15±2 (5)	14±2 (5)	14±2 (5)	15±2 (5)	<1	
PBP2x	3A+3E	3B	3C	3D		Others	202
FtsW	43±3 (15)	15±2 (5)	27±3 (10)	15±2 (5)		<1	
FtsZ	6A+6D	6B	6C			Others	250
PBP3	56±3 (15)	29±3 (10)	14±2 (5)			<2	

**a.** 2A-2F, 3A-3E and 6A-6D refer to the fluorescence patterns shown in Figures 2, 3 and 6, respectively.

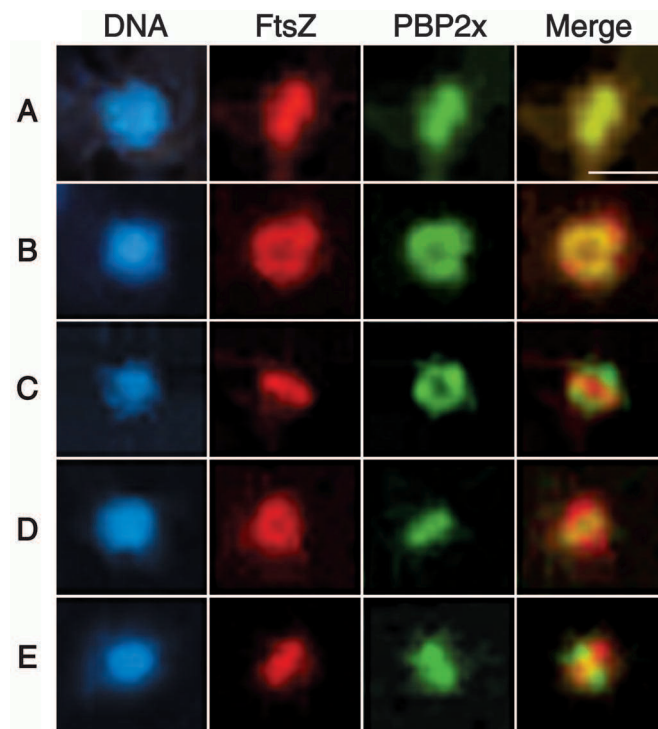


Fig. 1

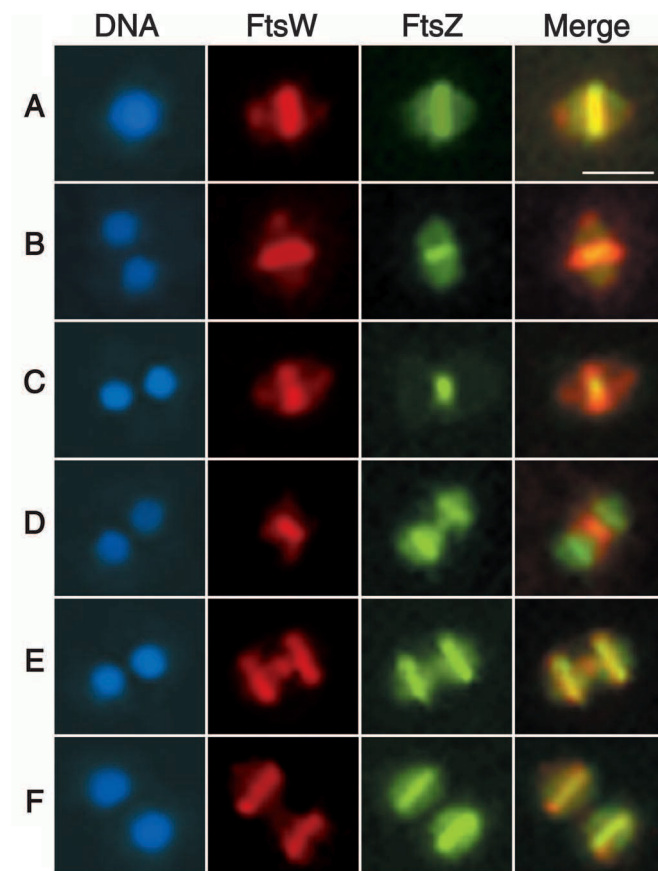


Fig. 2

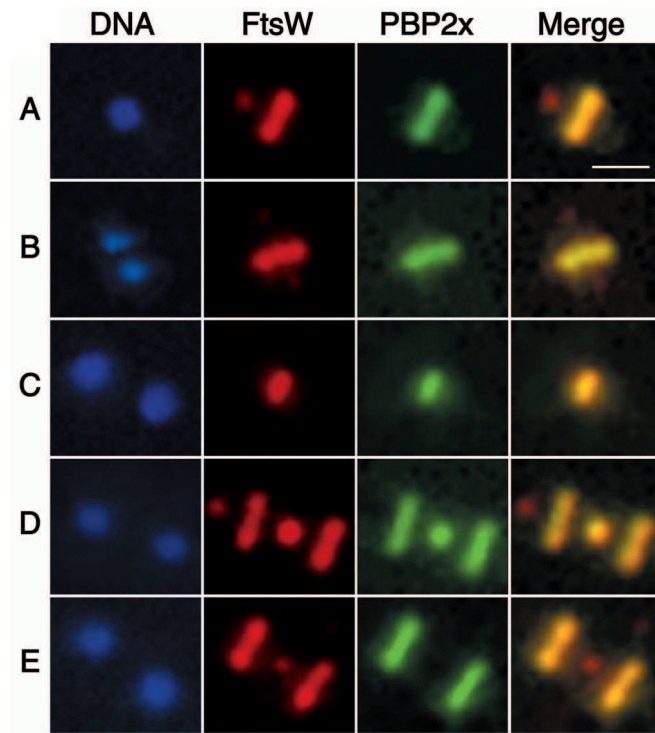


Fig. 3

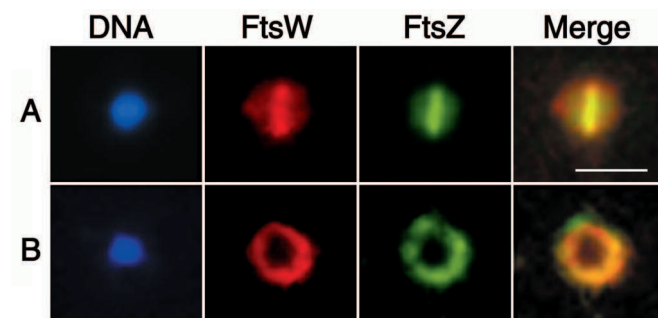


Fig. 4



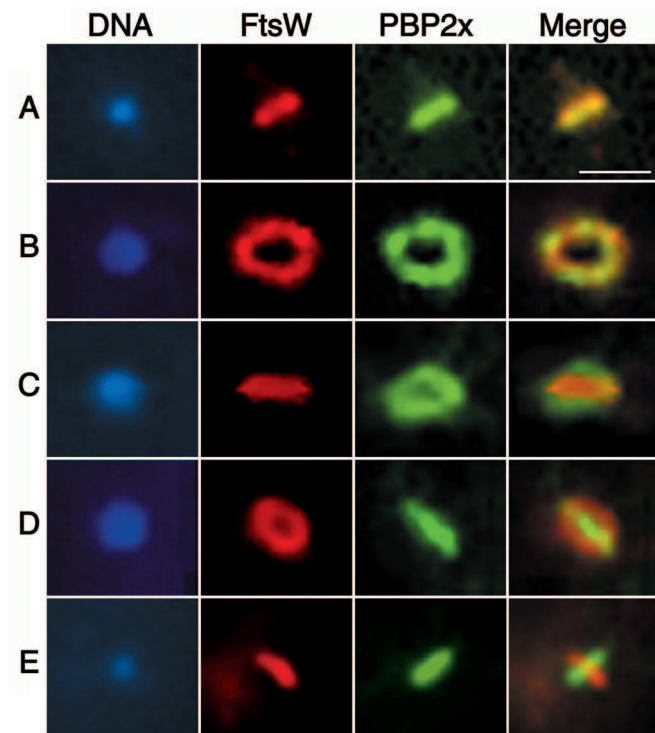


Fig. 5

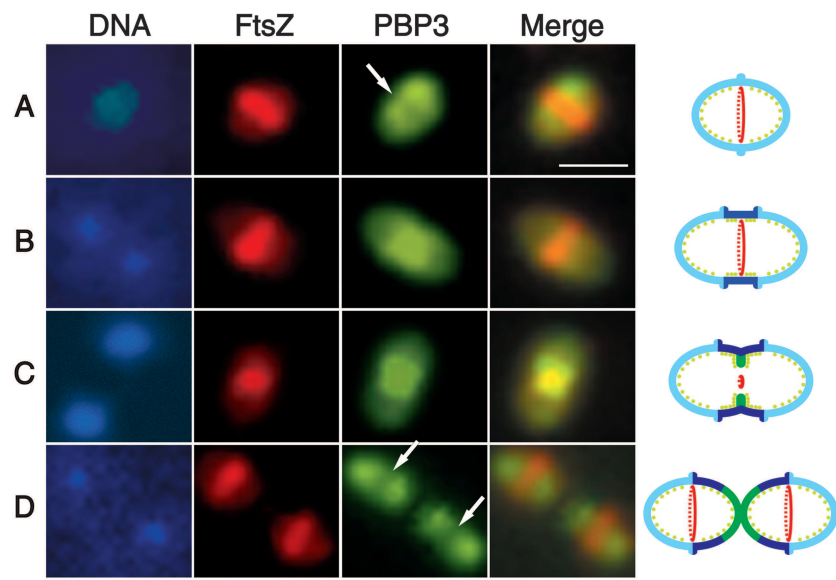


Fig. 6

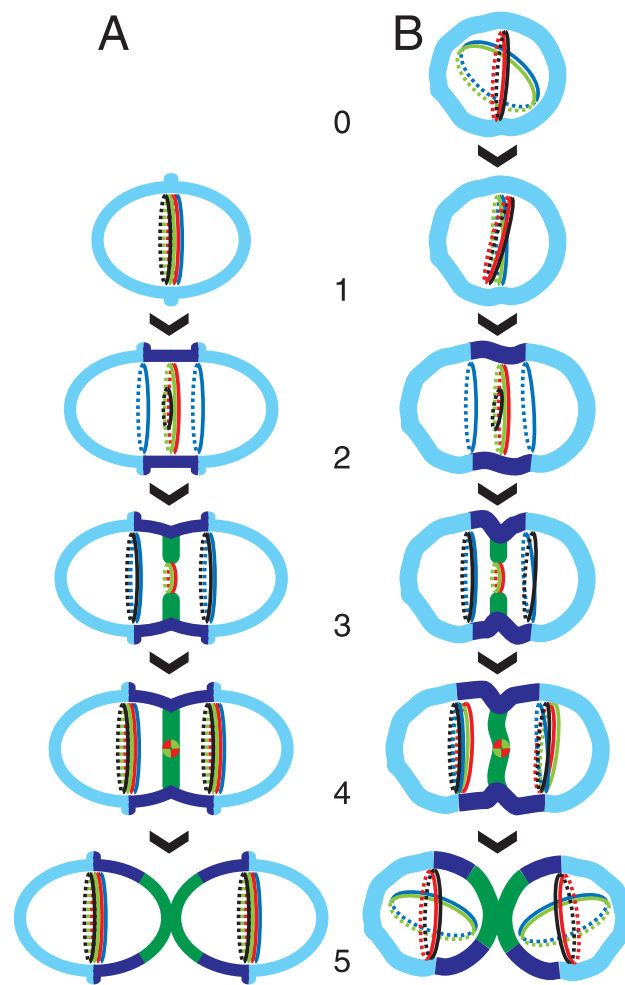


Fig. 7

**ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE-FONCTION DE LA  
D,D-CARBOXYPEPTIDASE PBP3**



## CARACTERISATION ENZYMATIQUE DE PBP3

### I. Titration de la quantité de sPBP3\* active

La concentration en sPBP3\* déterminée par la méthode de Bradford est équivalente à la quantité de protéine active déterminée par mesure de scintillation, ce résultat confirme l'homogénéité fonctionnelle de la préparation de sPBP3\*.

### II. Affinité de sPBP3\* pour différents antibiotiques

La benzylpénicilline a été utilisée comme référence pour mesurer l'affinité relative de sPBP3\* pour différents antibiotiques. Les résultats présentés dans le tableau I expriment, en % de la concentration en benzylpénicilline utilisée, la quantité d'un antibiotique donné nécessaire pour que ce dernier se fixe sur 50% des protéines (IC<sub>50</sub>). L'affinité de sPBP3\* pour les trois antibiotiques testés est toujours supérieure à celle de PBP2x. PBP2b possède une plus forte affinité pour la pipéracilline que sPBP3\*.

Tableau I. Affinité (IC<sub>50</sub>) de sPBP3\* pour trois β-lactamines, comparaison avec PBP2x et PBP2b.

Antibiotique	IC <sub>50</sub> (%)		
	sPBP3*	PBP2x <sup>a</sup>	PBP2b <sup>a</sup>
Benzyl-pénicilline	100 ± 14	2571	2570
Pipéracilline	7257 ± 14	7714	1131
Céfotaxime	1114 ± 14	3428	34280

a. Les valeurs indiquées pour PBP2x et PBP2b sont issues de (Pagliero *et al.*, 2003) et ont été normalisées par rapport à celles obtenues pour sPBP3\*.

### III. Vitesse de désacylation des complexes pénicilloyl-sPBP3\*

L'hydrolyse du complexe covalent formé entre une β-lactamine et une PBP conduit à la libération de l'antibiotique inactivé et de l'enzyme qui recouvre alors sa fonctionnalité. La

lenteur de cette réaction de désacylation confère un fort pouvoir inhibiteur aux  $\beta$ -lactamines. Le tableau II donne la valeur de la vitesse de désacylation pour différents complexes pénicilloyl-PBP. sPBP3\* présente une vitesse de désacylation du même ordre de grandeur que celles de toutes les PBPs de haute masse moléculaire du pneumocoque. En revanche, elle contraste avec la grande vitesse de désacylation de son homologue sauvage chez *E. coli*, PBP5, qui lui est 20 fois supérieure.

**Tableau II. Vitesse de désacylation de différents complexes [<sup>3</sup>H]-benzylpénicilline-PBP.**

Protéine	k <sub>3</sub> ( x 10 <sup>-5</sup> s <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> vie du complexe acyl-enzyme (h)	Références
sPBP3*	5.7	3.40	Ce travail
PBP2x*	3.5	5.80	(Mouz <i>et al.</i> , 1998)
PBP2b*	3.8	5.10	(Pagliero <i>et al.</i> , 2003)
PBP1a*	1.0	14.00	(Di Guilmi <i>et al.</i> , 1998)
PBP2a*	3.2	6.00	(Di Guilmi <i>et al.</i> , 1999)
PBP1b*	5.6	3.44	(Di Guilmi <i>et al.</i> , 2003)
sPBP5 ( <i>E. coli</i> )	110.0	0.17	(Nicholas et Strominger, 1988)
sPBP5' ( <i>E. coli</i> )	5.0	3.80	
K15 ( <i>Streptomyces</i> K15)	10	1.92	(Leyh-Bouille <i>et al.</i> , 1986)
TEM-1 ( <i>E. coli</i> )	1500	0.02	(Guillaume <i>et al.</i> , 1997)

#### IV. Efficacité d'hydrolyse du pseudo-substrat S2d

L'efficacité d'hydrolyse du S2d par sPBP3\* est de 20 à 600 fois supérieure à celle des PBPs de haute masse moléculaire de *S. pneumoniae* (Tableau III). Le fait que la réaction d'hydrolyse du S2d soit plus proche de l'activité D,D-carboxypeptidase catalysée PBP3 que de l'activité transpeptidase catalysée par les PBPs de haute masse moléculaire peut en partie expliquer la grande vitesse d'hydrolyse obtenue pour sPBP3\*. Toutefois, ce résultat pourrait également refléter un « turn-over » élevé de PBP3 au niveau de ses substrats naturels.

**Tableau III. Efficacité d'hydrolyse du pseudosubstrat S2d par 5 PBPs de *S. pneumoniae*.**

Protéine	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Références
sPBP3*	50500 ± 2500	Ce travail
PBP2x*	2500	(Mouz <i>et al.</i> , 1998)
PBP2b*	80	(Pagliero <i>et al.</i> , 2003)
PBP1a*	256	(Di Guilmi <i>et al.</i> , 1998)
PBP2a*	220 ± 20	(Di Guilmi <i>et al.</i> , 1999)

## ETUDE STRUCTURALE DE PBP3

### I. Cristallisation de sPBP3\* native

#### I.1. Conditions de cristallogénèse

Dans un premier temps, deux matrices de criblage contenant chacune une cinquantaine de conditions de cristallogénèse différentes ont été utilisées, il s'agit des matrices commercialisées par la compagnie Hampton Research sous les noms de Crystal Screen I et II. La concentration protéique des gouttes était de 10 mg/mL et le criblage a été réalisé à 20°C.

Les différentes conditions favorables à la formation de précipités cristallins sont résumées dans le tableau IV.

**Tableau IV. Tableau récapitulatif des concentrations favorables à l'apparition de précipités cristallins de sPBP3\*.**

Sels	Tampon	Précipitant
0.2 M acétate d'ammonium	0.1 M acétate de sodium pH 4.6	0.3 g/mL PEG 4000
0.2 M sulfate d'ammonium	0.1 M acétate de sodium pH 4.6	0.25 g/mL PEG 4000
0.2 M sulfate d'ammonium		0.3 g/mL PEG 4000
1.0 M sulfate de lithium		0.02 g/mL PEG 8000
2.0 M sulfate d'ammonium		5% (v/v) iso-propanol
0.2 M tartrate mixte de potassium et de sodium	0.1 M citrate tri-sodique pH 5.6	2.0 M sulfate d'ammonium

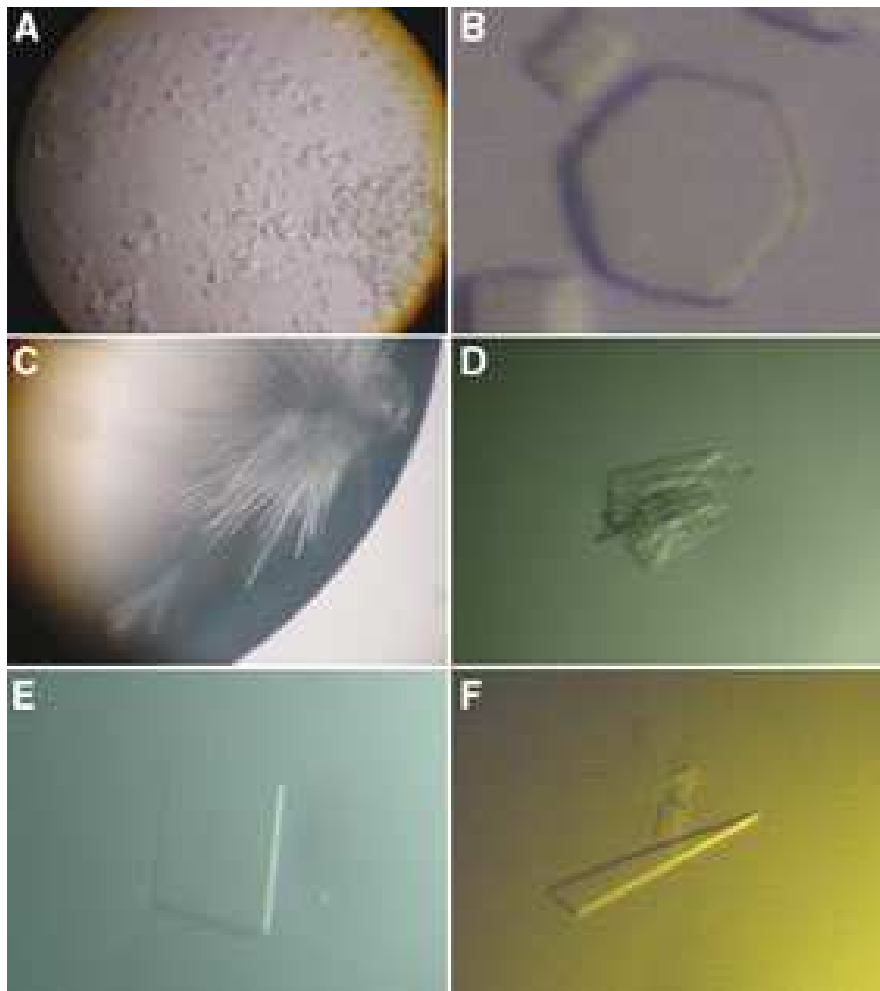
Pour chacune de ces conditions, nous avons fait varier la concentration en précipitant en testant simultanément trois rapports de dilution protéique (3/4, 1/2 et 1/3). Des micro-cristaux sont apparus lorsque la protéine, à une concentration de 7.5 ou de 5 mg/mL, a été mise en présence de 0.2 M de tartrate mixte de sodium et de potassium, de 0.1 M de citrate tri-sodique à pH 5.6 et 1.7 M de sulfate d'ammonium (Solution A). Ces conditions ont donc été retenues pour tester différentes molécules additives et détergentes à l'aide des kits Additive Screen I, II et III et Detergent Screen I, II et III, commercialisés par la compagnie Hampton Research, dans le but d'augmenter la taille des cristaux et de multiplier les formes cristallines.

En ajoutant divers additifs (Tableau V), dont la spermidine, une première forme cristalline hexagonale a été obtenue (Figures 1A et 1B).



**Tableau V. Caractéristiques des cristaux de sPBP3\* en fonction de la composition du tampon de cristallogénèse.**

Réservoir		Goutte		Caractéristiques des cristaux
Tampon de base	Additif 2	Pour 3.5 µl total	Additif 1	
Solution A		1.5 µl réservoir 1.5 µl protéine (5.0-7.5 mg/ml)	14 mM spermidine	Hexagones 60 x 60 x 20 µm
Solution A			6% (v/v) acétonitrile	Hexagones 50 x 50 x 20 µm
Solution A			0.04% dichlorométhane	Hexagones 50 x 50 x 20 µm
Solution A			6% (v/v) 2,5 hexanediol	Hexagones 50 x 50 x 20 µm
Solution A			142 mM iodure de sodium	Aiguilles 100 x 5 x 5 µm
Solution A	2% (v/v) glycérol		142 mM iodure de sodium	Aiguilles 200 x 15 x 15 µm
Solution A	3% (v/v) PEG 400		142 mM iodure de sodium	Faisceaux de plaques 300 x 200 x 15 µm
Solution A'	3% (v/v) PEG 400		1.5 µl réservoir 1.5 µl protéine (3.5-4.5 mg/ml)	142 mM iodure de sodium



**Figure 1. Les différentes formes cristallines de sPBP3\* native (A à D) ou sélénée (E et F).** La protéine native et la protéine sélénée forment des cristaux semblables dans des conditions de cristallisation similaires. A : Cristaux hexagonaux dans une goutte. B : Vue rapprochée d'un cristal hexagonal. C : Aiguilles dans une goutte. D : Faisceau de plaques. E-F : Agrandissement de deux types de plaques.

Les cristaux ont été soumis à différents tests pour vérifier leur nature protéique. Le premier d'entre eux a consisté à éprouver la résistance mécanique des cristaux en les cassant à l'aide d'une aiguille fine : les cristaux n'ont pas opposé de résistance mécanique et leur fissuration a été silencieuse, caractéristiques présentées classiquement par des cristaux de protéine. Dans un deuxième temps, nous avons testé la coloration des cristaux par le bleu de méthylène. Les cristaux de protéine sont constitués d'une forte proportion de solvant, en général entre 30 et 75% d'eau. Ce solvant, organisé en canaux plus ou moins étendus traversant le cristal, permet de faire pénétrer des solutés de taille moyenne tels que certains colorants organiques possédant une forte affinité pour les protéines. Les cristaux mis en présence de bleu de méthylène se sont effectivement colorés en bleu. Enfin, les cristaux ont été lavés, dissous et soumis à une analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La révélation du gel par Western Blot a confirmé la présence, l'identité, et l'intégrité de la protéine dans les cristaux. Forts de ces premiers résultats positifs, nous avons ensuite testé la diffraction de ces cristaux sur le diffractomètre du Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire (LCM, Institut de Biologie Structurale, Grenoble). Les cristaux n'ont pas diffracté les rayons X à une résolution meilleure que 15 Å.

Les aiguilles, qui constituaient la deuxième forme cristalline, ont passé tous les tests de qualité cités précédemment mais étaient trop fines pour être soumises à un essai de diffraction. Nous avons alors testé différents cryoprotectants dans le but de ralentir la nucléation afin d'augmenter la taille de ces cristaux. La taille des aiguilles formées en présence de glycérol (Tableau V) était suffisante pour que ces derniers puissent être testés sur le diffractomètre (Figure 1C). Aucune diffraction n'a pu être observée. En présence de 3% (v/v) de PEG (Polyéthylène Glycol) 400, les aiguilles se transforment en faisceaux de plaques (Figure 1D). Des cristaux isolés sont finalement obtenus en abaissant la concentration de la solution de citrate de sodium à 150 mM et en diminuant la concentration protéique de la goutte à 3.5-4.5 mg/mL (voir Figure 1E et 1F). Ces cristaux ont des dimensions d'environ 400 x 300 x 15 µm et diffractent les rayons X jusqu'à 3.0 Å de résolution.

## **I.2. Conditions de cryocongélation des cristaux de sPBP3\***

La résistance mécanique des cristaux de sPBP3\* s'est révélée croître avec la concentration en sulfate d'ammonium, avec la concentration en cryoprotectant et avec la durée d'incubation du cristal dans la solution de cryoprotection. Par ailleurs, à haute

concentration, le sulfate d'ammonium précipite en présence d'un grand nombre de cryoprotectants, et en particulier avec les PEG qui s'avéraient être peu agressifs envers nos cristaux. Un protocole établissant le meilleur compromis entre résistance des cristaux et pouvoir cryoprotecteur des molécules a donc du être mis au point : les cristaux sont d'abord lavés rapidement dans une solution mère composée de 0.2 M de tartrate mixte de sodium et de potassium, de 0.1 M de citrate tri-sodique à pH 5.6, de 1.9 M de sulfate d'ammonium, à laquelle on ajoute 2% (v/v) d'éthylène glycol et 5% (v/v) de glycérol. Ils sont ensuite trempés moins d'une minute dans la solution mère additionnée de 2% (v/v) d'éthylène glycol et de 20% (v/v) de glycérol avant d'être congelés. Si les cristaux sont laissés plus d'une minute dans chacune des solutions, des fissures apparaissent très rapidement et la qualité de diffraction du cristal chute dramatiquement.

### I.3. Caractérisation des cristaux natifs de sPBP3\*

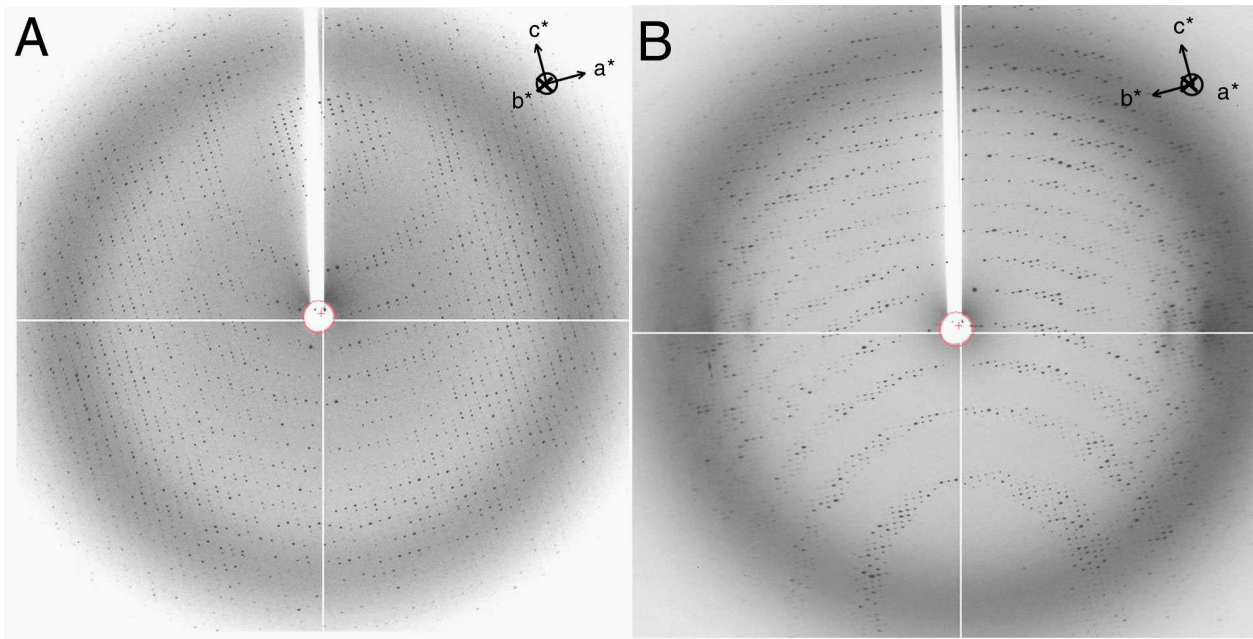
Un premier enregistrement de données de diffraction à une résolution de 3 Å d'un cristal natif a été réalisé sur la ligne de lumière ID14-EH2 à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) de Grenoble à l'aide d'un détecteur ADSC Quantum 4 CCD (Tableau VI).

**Tableau VI. Conditions d'enregistrement des données de diffraction du cristal natif de sPBP3\*.**

Longueur d'onde (Å)	0.9333
Détecteur	ADSC Q4 CCD
Distance cristal-détecteur (mm)	200
Domaine angulaire (°)	180
Incrément par image (°)	1
Temps de pose par image (s)	2

Une des caractéristiques de la diffraction de ces cristaux est son anisotropie prononcée. Les taches de diffraction sont beaucoup moins intenses dans la direction  $b^*$  que le long des axes  $a^*$  et  $c^*$  (Figure 2A). Par ailleurs, si les taches de diffraction sont correctement définies le long des axes  $a^*$  et  $c^*$ , elles apparaissent très larges le long de l'axe  $b^*$ , révélant une forte mosaïcité dans cette direction (Figure 2B). Ces caractéristiques révèlent une désorganisation macroscopique du cristal qui peut, dans notre cas, soit être une caractéristique intrinsèque des cristaux de sPBP3\*, soit apparaître lors de la congélation des cristaux. En effet, les cristaux de sPBP3\* sont peu épais et ont tendance à se bomber lorsqu'ils sont congelés. Nous avons tenté de monter les cristaux en tube capillaire de verre afin de prendre

une image de diffraction sans cryocongélation préalable pour déterminer l'origine de leur anisotropie. La faible épaisseur des cristaux ne leur a pas permis de résister à la force de tension superficielle, ils se sont cassés systématiquement et aucune diffraction n'a pu être observée par cette méthode. Aucun des cryoprotectants testés (une vingtaine) n'a permis de résoudre ce problème d'anisotropie qui n'a pu être éliminé dans les enregistrements finaux.



**Figure 2. Images représentatives de la diffraction d'un cristal de sPBP3\*.** Ces deux images ont été enregistrées sur un cristal de sPBP3\* sélénée à l'ESRF sur la ligne de lumière ID14-EH4 avec un détecteur de type ADSC Quantum 4R CCD. Une rotation de  $90^\circ$  a été effectuée autour de l'axe  $c^*$  entre les clichés A et B. On notera la forte anisotropie de diffraction : les taches de diffraction sont bien définies le long des axes  $a^*$  et  $c^*$  (A) mais sont très allongées le long de l'axe  $b^*$  (B).

Les images de diffraction ont été traitées avec le programme Denzo pour l'auto-indexation et la détermination du groupe d'espace et avec le module Scalepack pour l'intégration des réflexions et leur mise à l'échelle. Le groupe d'espace des cristaux est  $P2_12_12_1$  et le nombre de molécules dans l'unité asymétrique a été estimé à 4 en prenant pour contenu théorique en solvant dans le cristal un pourcentage de solvant de 56% (Matthews, 1968). Aucun axe de symétrie non cristallographique n'a pu être identifié par la fonction de self rotation calculée avec le programme AMoRe.

## II. Premières tentatives de détermination de la structure de sPBP3\*

Dans les paragraphes suivants seront décrites de façon succincte les différentes tentatives non abouties pour tenter de déterminer les phases des facteurs de structure des différents jeux de données enregistrées.

### II.1. Le remplacement moléculaire

Les coordonnées de la PBP2x de *S. pneumoniae* (code PDB : 1PMD, (Pares *et al.*, 1996)) de la D,D-tranpeptidase de *Streptomyces* K15 (code PDB : 1SKF, (Fonze *et al.*, 1999)) et de la D,D-carboxypeptidase-transpeptidase de *Streptomyces* R61 (code PDB : 3PTE, (Kelly *et al.*, 1989)) étaient disponibles dans la banque des structures de protéines (PDB) lorsque ces travaux de détermination de structure ont été entrepris. L'identité de séquence de ces protéines avec PBP3 étant inférieure à 15%, les coordonnées de ces PBPs n'ont donc pas pu être utilisées pour tenter d'obtenir une première estimation des phases.

L'identité de séquence entre PBP3 et son homologue PBP5 chez *E. coli* est de 27%. La structure d'un mutant inactif de PBP5 a été résolue et dès que les coordonnées de ce mutant ont été disponibles dans la PDB (code PDB : 1NJ4, (Nicola *et al.*, )), nous avons appliqué la méthode du remplacement en utilisant un modèle en polyalanine, d'abord de la protéine complète, puis du domaine de liaison à la pénicilline. Aucune tentative n'a abouti. Nous avons donc tenté d'estimer expérimentalement les phases par la méthode du remplacement isomorphe multiple dont les résultats sont décrits dans le paragraphe suivant.

### II.2. La méthode du remplacement isomorphe multiple (MIR)

En présence de certains complexes d'atomes lourds, les cristaux de sPBP3\* se fissuraient ou éclataient immédiatement. Dans tous les autres cas, une dégradation des cristaux, plus ou moins tardive en fonction de la nature et de la concentration du composé, mais systématique, était observée au-delà d'une heure de trempage (Tableau VII). Les complexes de tétra-chloro platinate de potassium ( $K_2PtCl_4$ ) et de Chlorure de Terbium ( $TbCl_3$ ) ont donné des dérivés sur lesquels des données de diffraction ont été enregistrées à l'ESRF sur la ligne ID14-EH4. L'absence de pics dans les cartes de Patterson isomorphes a

révélé la non-substitution de ces cristaux dérivés. Tous les autres composés ont provoqué la perte instantanée ou très rapide du signal de diffraction, une fois les cristaux placés dans le faisceau de rayons X.

**Tableau VII. Tests des différents composés d'atomes lourds sur des cristaux natifs de sPBP3\*.**

Composés d'atome lourd	Concentration (mM)	Temps de trempage (min)	Effet morphologique sur le cristal	Limite de résolution (Å)
Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.5	60	Aucun	3.9
		120	Fissures	8.0
	1.0	< 1	Explosion	
PIP4 (nitrate de di-_iodobis- (éthylènediamine) di- platinum)	0.5	60	Fissures	4.0
		120		> 8.0
	1.0	< 1	Explosion	
K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub>	0.25	60	Aucun	3.9
		120	Fissures	> 8.0
	0.5	60		> 8.0
TbCl <sub>3</sub>	0.25	60	Aucun	3.15
		120		4.0
	0.5	60	Fissures	> 8.0
KAuCl <sub>4</sub>	0.1	< 1	Explosion	
OsCl <sub>3</sub>	0.1	15	Fissures	> 8.0
	0.25	15	Explosion	
K <sub>2</sub> Pd Cl <sub>6</sub>	0.1	60	Fissures	> 8.0
	0.25	< 1	Explosion	
Gd-DO3A	100	15	Fissures	> 8.0
Gd-HPDO3A	100	15	Fissures	3.0
		60		> 8.0

Plus tard, nous avons tenté d'obtenir des cristaux de sPBP3\* avec deux composés de gadolinium (Girard *et al.*, 2002; Girard *et al.*, 2003). La co-cristallisation en présence de 100mM de Gd-DO3A ou de Gd-HPDO3A a permis d'obtenir des cristaux à 15 et à 20°C, mais ces cristaux étaient très instables et se dissolvaient instantanément à l'ouverture du réservoir de cristallisation. En ce qui concerne les essais de trempage, la diffraction des cristaux n'a pas été altérée en dessous de 15 minutes de trempage en présence de 100 mM de Gd-HPDO3A. Nous nous apprêtions à enregistrer des données de diffraction au synchrotron sur ces cristaux dérivés lorsque nous avons obtenu les premiers cristaux de protéine sélénée. Les enregistrements sur les cristaux dérivés du gadolinium n'ont donc jamais été effectués.

### III. Détermination de la structure de sPBP3\* par la méthode MAD

#### III.1. Contrôle de la substitution des méthionines par spectrométrie de masse

La mesure d'un spectre de masse sur la protéine sélénée montre la présence d'une espèce unique à 41643 Da, correspondant à la masse de la protéine sauvage (41221 Da) additionnée de la différence sélénium-soufre des 9 méthionines sélénées (423 Da). Les résultats confirment donc que les 9 méthionines de sPBP3\* sont substituées par des sélénométhionines dans la totalité des protéines (Figure 3) et l'absence d'épaulement au niveau du pic montre que les atomes de sélénium ne sont pas oxydés.

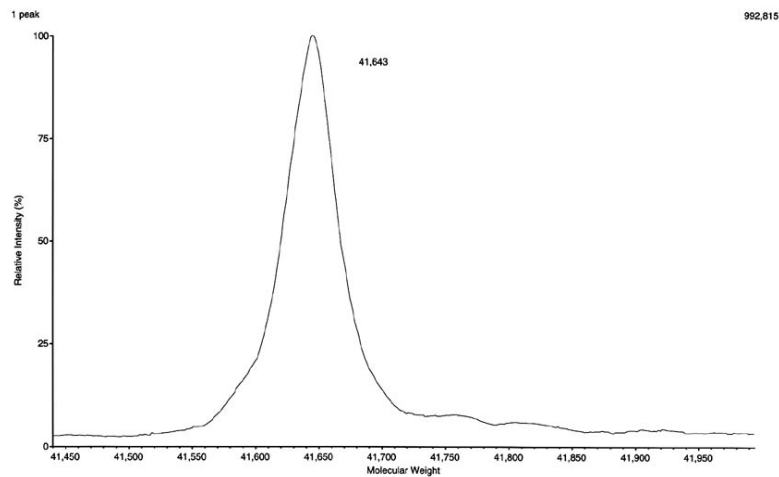


Figure 3. Spectre de masse obtenu par électrospray sur sPBP3\* sélénée.

#### III.2. Cristallisation de l'enzyme sélénée

Les conditions de cristallisation de sPBP3\* sélénée sont identiques à celles de l'enzyme sauvage avec un ajustement de pH : la solution de citrate de sodium n'est plus tamponnée à pH 5.6 mais à pH 5.8. Les cristaux obtenus sont de taille (600 x 400  $\mu\text{m}$  x 20  $\mu\text{m}$ ) supérieure à celle de la protéine native. Leur diffraction est, par ailleurs, de meilleure qualité : la résolution est supérieure (2.8 contre 3.0 Å) et la dégradation des cristaux due aux rayons X est environ trois fois plus lente. En revanche, le problème d'anisotropie persiste (Figure 2).

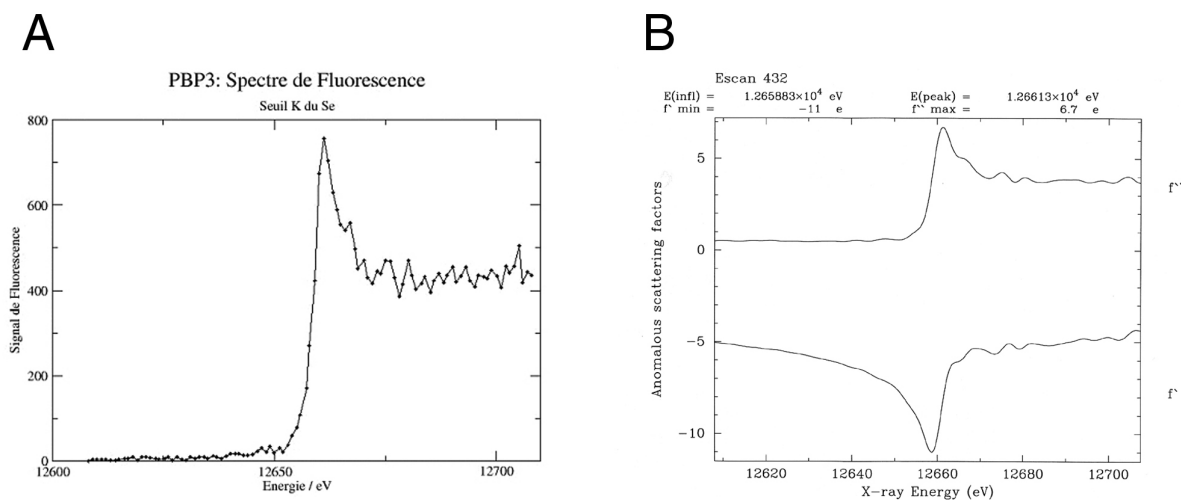
### III.3. Enregistrement et traitement du jeu de données MAD

L'enregistrement des données MAD qui ont mené à la résolution de la structure de sPBP3\* a été réalisé sur la ligne de lumière ID14-EH4 à l'ESRF de Grenoble à l'aide d'un détecteur ADSC Quantum 4R CCD (Tableau VIII).

	Pic	Point d'inflexion	Hors seuil
Longueur d'onde (Å)	0,9792	0,9794	0,9393
Détecteur	ADSC Q4	ADSC Q4	ADSC Q4
Distance cristal - détecteur (mm)	260	260	260
Domaine angulaire (°)	140	140	140
Incrément par image (°)	2	2	2
Temps d'exposition par images (s)	3 en 3 osc	3 en 3osc	3 en 3osc
$f'$ (e-)	-8,2	-11	-2,4
$f''$ (e-)	4	6,7	3,5

**Tableau VIII. Conditions d'enregistrement des données de diffraction sur un cristal de sPBP3\* séléniée.**

Un spectre de fluorescence X au seuil K du sélénium (Figure 4A) a été enregistré sur le cristal de sPBP3\* séléniée congelé à 100 K afin de calculer les valeurs  $f'$  et  $f''$  nécessaires à la détermination des trois longueurs d'onde de l'enregistrement (Figure 4B).



**Figure 4. Spectre de fluorescence du cristal de sPBP3\* sélénié au seuil K du sélénium (A) et facteurs de diffusion anormale autour du seuil du sélénium (B).** Les valeurs de  $f'$  et  $f''$  sont évaluées à partir du spectre de fluorescence X par le programme CHOOCH [Evans, 2001 #320].

Il est intéressant de noter que malgré la résistance des cristaux séléniés meilleures que celle des cristaux natifs, la mesure du spectre de fluorescence a été délicate avec les cristaux de sPBP3\* car ces derniers se dégradent assez rapidement sous l'action du rayonnement X et la diffraction de certains d'entre eux chutait dramatiquement après la mesure de fluorescence. Trois longueurs d'onde ont été choisies et les données ont été enregistrées dans l'ordre suivant : la première au pic, la deuxième hors seuil et la troisième au point



d'inflexion. Ces trois jeux de données ont été enregistrés sur un même cristal de sPBP3\* sélénée. Les intensités de tous les jeux de données sont intégrées avec le programme MOSFLM (Leslie, 2002). La mise à l'échelle et la réduction des données est réalisée avec le programme SCALA et l'extraction des amplitudes des facteurs de structure avec le programme TRUNCATE issu de la chaîne de programme du CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994). Les statistiques d'intégration sont reportées dans le tableau IX.

**Tableau IX. Statistiques d'intégration des données de diffraction enregistrées sur un cristal de sPBP3\* sélénée.**

	Pic	Point d'inflexion	Hors seuil
Longueur d'onde (Å)	0,9792	0,9794	0,9393
Gamme de résolution (Å)	66,0 - 2,8	66,1 - 3,0	66,0 - 2,8
Nombre de réflexions observées	255278	200354	249511
Nombre de réflexions uniques	47073	38767	47278
Rsym (%)	10,2 (27,9)	16,1 (50)	13,9 (46,6)
Complétude (%)	99,9 (100)	99,8 (99,7)	99,8 (100)
Rapport signal sur bruit I/σ(I)	12,7 (4,7)	9,65 (2,93)	9,94 (2,99)
Rano(%)	7,9 (16,0)	9,0 (25,5)	7,8 (23,6)
Complétude anormale (%)	99,2 (98,1)	98,6 (97,5)	98,8 (99,0)
Multiplicité	5,4 (5,0)	5,2 (4,8)	5,3 (5,0)

Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution (2.95-2.8 Å pour l'enregistrement au pic et l'enregistrement hors seuil et 3.13-3.0 Å pour l'enregistrement au point d'inflexion).

Comme pour les cristaux natifs, les cristaux de sPBP3\* sélénée présentent une haute mosaïcité et nous avons là aussi observé, sur les clichés de diffraction ainsi que lors de la réduction des jeux de données, une décroissance anisotrope de l'intensité diffractée suivant la direction du paramètre b\* (Figure 2). Ceci nous a conduit dans les étapes suivantes à appliquer un facteur d'échelle anisotrope pour l'affinement des paramètres des diffuseurs anomaux ainsi que lors de l'affinement cristallographique.

Les jeux de données ont été mis à l'échelle par rapport au jeu de données 'pic' avec le programme SCALEIT. Dans le tableau X, ρ représente le facteur de corrélation calculé sur les différences anormales entre deux longueurs d'onde. Il permet d'évaluer si les différences anormales sont significatives.

Tableau X. Comparaison statistique entre les trois jeux de données.

	Pic	Point d'inflexion	Hors seuil
Pic	-	Riso = 0,11 ; ρ = 0,375	Riso = 0,083 ; ρ = 0,318
Point d'inflexion	-	-	Riso = 0,097 ; ρ = 0,254

### **III.4. Détermination de la position des diffuseurs anomaux et calcul des phases**

Les positions des atomes lourds de sélénium ont été déterminées par méthode directe en utilisant le programme ShelX-d (Sheldrick, 1998; Sheldrick, 1997). La recherche de la position des atomes lourds a été effectuée avec le jeu de données enregistré au pic et en utilisant comme intensités expérimentales les différences anomaux au carré ( $\Delta_{ano}$ )<sup>2</sup>. Le nombre de sites identifiés dans cette étape est de 25.

Ces sites ont été introduits dans le programme SHARP (de La Fortelle et Bricogne, 1997) et les paramètres décrivant ces sites (position x,y,z taux d'occupation et facteur d'agitation thermique) ont été affinés en utilisant les trois jeux de données. Les cartes résiduelles ont également été utilisées pour la recherche de sites d'atomes lourds supplémentaires, qui ont à leur tour été affinés.

Après 5 cycles d'affinement des paramètres d'atomes lourds et identification de sites supplémentaires, 44 sites ont été identifiés. Nous retrouvons bien les 36 sites (4x9 sélénométhionines) correspondant au 4 monomères de PBP3 dans l'unité asymétrique. Il reste 8 sites de nature chimique différente à identifier. Ces sites supplémentaires pourraient correspondre à des ions d'iodure. En effet, de l'iodure de sodium est présent dans le tampon de cristallisation à une concentration de 142 mM. La détermination de la configuration absolue de la sous-structure des atomes lourds de sélénium (choix de la main) a été effectuée à l'aide du programme ABS.

Les phases ont été déterminées à l'aide du programme SHARP en utilisant le jeu de donnée de diffraction enregistré au pic comme jeu de référence. Les phases ont été améliorées par la méthode du nivellement de solvant et ajustement de l'histogramme de densité avec les programmes DM et SOLOMON, en fixant le contenu de solvant dans le cristal à 45%. Les statistiques de phasage sont reportées dans le tableau XI.

La carte de densité électronique obtenue à une résolution de 2,8 Å est de bonne qualité comme le montre la figure 5.

Tableau XI. Représentation graphique des statistiques de phasage des facteurs de structure de sPBP3\*.

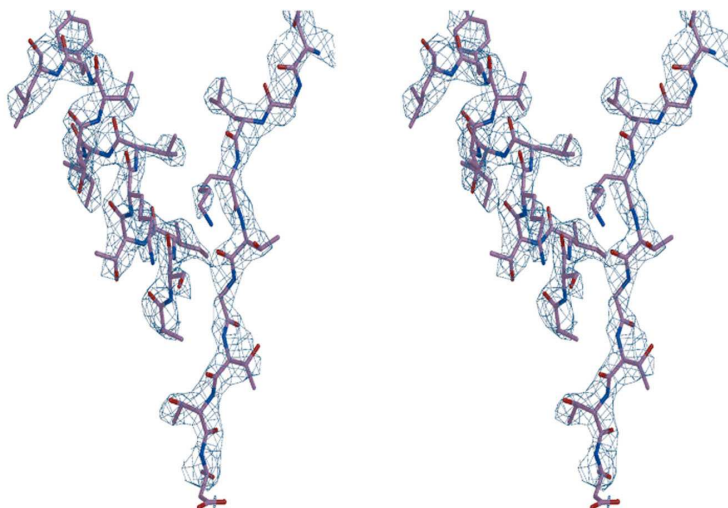
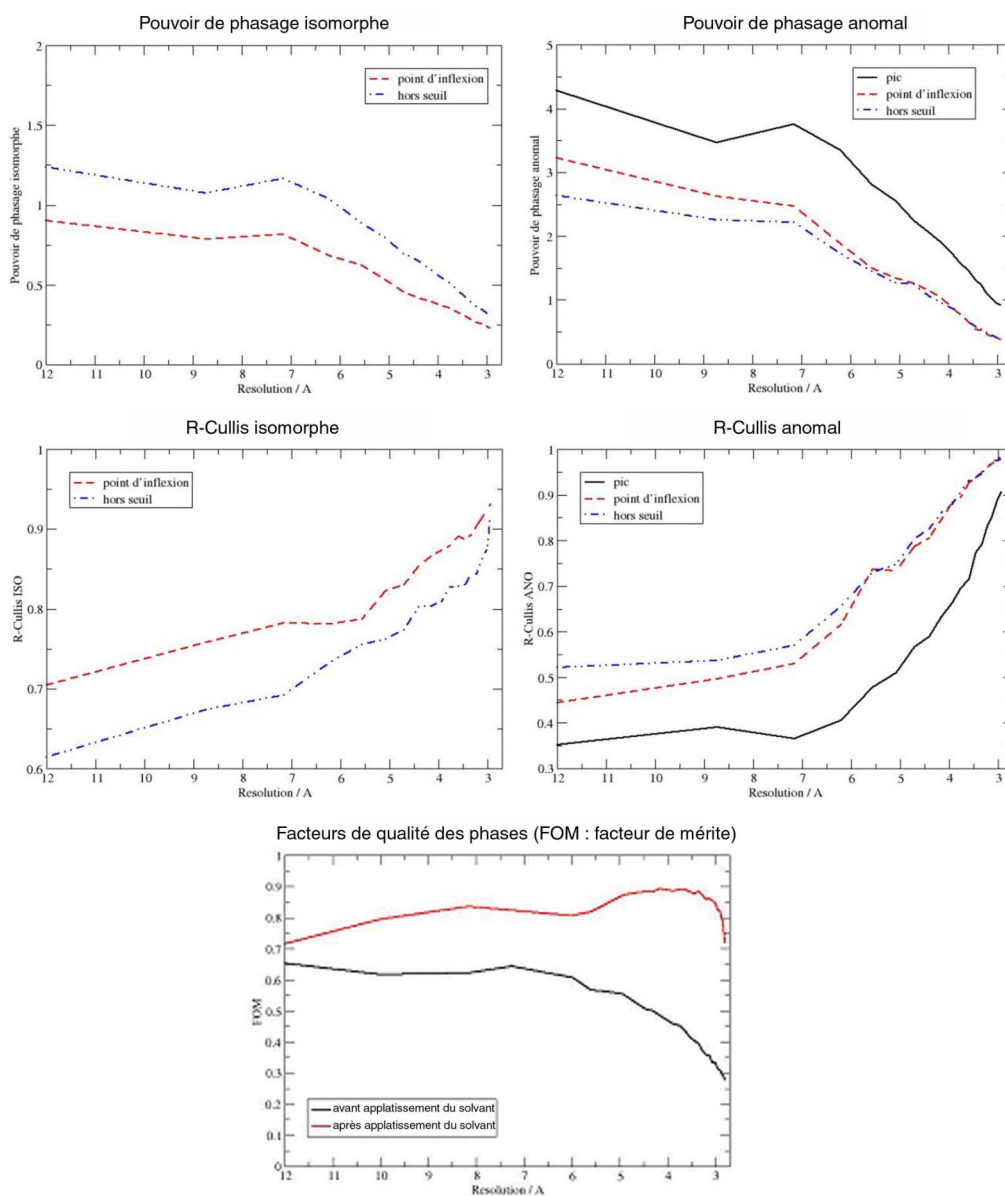


Figure 5. Vue stéréographique de la carte de densité électronique MAD à 2,8 Å contournée à 1σ. La structure affinée de sPBP3\* est superposée à la carte de densité électronique.

### III.5. Première construction automatique d'un modèle de sPBP3\* à 2.8 Å

Bien que la résolution des données de diffraction ne soit que de 2,8 Å, une construction automatique de la chaîne des carbones  $\alpha$  de sPBP3\* dans la carte de densité électronique MAD a été tentée avec le programme ARP/wARP.

La chaîne principale d'une des quatre molécules de l'unité asymétrique (molécule A) a été construite de la façon la plus complète par le programme ARP/wARP (320 résidus identifiés sur 368 résidus au total, dans le domaine N- et C-terminal). Autour de cette première molécule, le programme a tracé des chaînes séparées qui ont permis d'identifier les 3 autres molécules dans l'unité asymétrique.

## IV. Construction et affinement du modèle de sPBP3\* sélénié

### IV.1. Construction du modèle de sPBP3\* dans la carte MAD

La carte de densité électronique étant mieux définie sur la molécule A, cette dernière a été utilisée pour construire le modèle de sPBP3\* en utilisant le programme *O* (Jones *et al.*, 1991). La densité électronique des atomes de sélénium est beaucoup plus forte que celle des autres atomes de la protéine, elle a donc permis de localiser et de valider aisément les positions des sites de sélénium. Les résidus ont été attribués sur la molécule A, nous avons ensuite superposé ce premier modèle sur les régions de la chaîne construite par ARP/wARP correspondant aux trois autres molécules présentes dans l'unité asymétrique.

### IV.2. Affinement du modèle de sPBP3\* sélénié

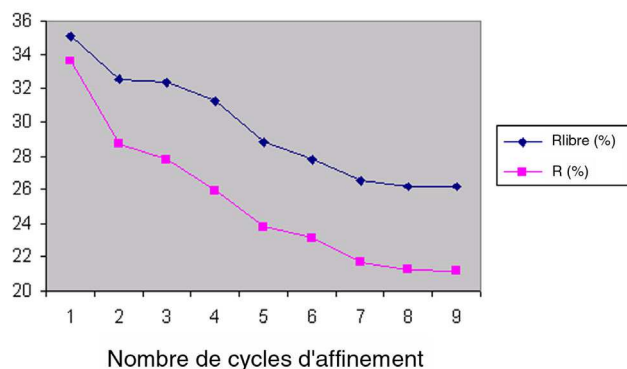
L'étape d'affinement permet d'ajuster le modèle (position des atomes, facteurs d'agitation thermique, molécules de solvants, ...) afin qu'il corresponde au mieux aux informations expérimentales (longueurs et angles de liaisons, ...) et de minimiser les différences entre les facteurs de structure observés et calculés. Le programme *CNS* (Brunger *et al.*, 1998) permet d'affiner le modèle et d'évaluer sa vraisemblance avec les phases expérimentales obtenues par la méthode MAD. Les cartes de densité pondérées sigmaa ( $3F_o - 2F_c$  et  $F_o - F_c$ ) sont également calculées par *CNS*.

Ne disposant pas d'un meilleur jeu de données de diffraction sur un cristal natif de sPBP3\*, ni d'un autre jeu de données à plus haute résolution enregistré sur un cristal de sPBP3\* sélénée, l'affinement de la structure de sPBP3\* a été effectué avec le jeu de données de diffraction enregistré au pic. Nous avons immédiatement entrepris l'affinement du modèle de sPBP3\* en introduisant des contraintes. La bibliothèque contenant les valeurs de  $f'$  et  $f''$  a été modifiée pour les atomes de sélénium ( $f' = x$  électrons et  $f'' = y$  électrons) afin de tenir compte de l'enregistrement au pic du seuil d'absorption K du sélénium.

Une dizaine de cycles d'affinement ont été effectués ; après chaque cycle, le modèle a été corrigé manuellement à l'aide du programme *Quanta* en utilisant les cartes de densité électronique pondérées  $\sigma_{\text{max}}$  ( $3F_o - 2F_c$ ) et  $(F_o - F_c)$  ainsi que la carte MAD. A partir du cinquième cycle, les molécules d'eau ont été ajoutées à l'aide de la procédure « water\_pick » de *CNS*, en fixant le niveau de recherche des pics au-dessus de 3 sigma dans la carte de différence  $F_o - F_c$ . L'ion sulfate et les 4 ions iodure présents dans chaque molécule ont été introduits manuellement. Dans chacune des molécules, 2 ions iodure sont présents avec un taux d'occupation de 1, le taux d'occupation des deux autres a été affiné à l'aide de la procédure « qgroup » de *CNS*.

### IV.3. Résultats

La figure 6 montre l'évolution des facteurs d'accord cristallographique au cours de l'affinement. La structure de sPBP3\* comprend 369 résidus pour la molécule A, une centaine de molécules d'eau, 1 ion sulfate et 4 ions iodure par molécule. Le facteur d'accord cristallographique est 22.4 % et le facteur d'accord cristallographique libre est 26.7 %.



**Figure 6. Evolution des facteurs R et Rlibre au cours de l'affinement de la structure de sPBP3\*.**

#### IV.4. Validité du modèle

Le tableau XII présente les statistiques du modèle de PBP3 à la fin de l'affinement. Ces paramètres sont satisfaisants, la géométrie du modèle est correcte.

**Tableau XII. Résumé des statistiques du modèle à la fin de l'affinement.**

Résolution (Å)	2.80
Facteur R (%)	21.2
Facteur R <sub>libre</sub> (%)	26.2
Nombre de résidus	
Chaîne A	369
Chaîne B	350
Chaîne C	368
Chaîne D	340
Nombre de molécules d'eau	477
Nombre d'iodes	16
Nombre de sulfates	4
Nombre de réflexions	47009
B <sub>moyen</sub> (Å <sup>2</sup> )	
Modèle entier	29.33
Protéines	29.51
Chaînes principales	29.12
Chaînes latérales	29.94
Solvant	33.30
Ecarts types moyens	
Liaisons (Å)	0.01
Angles (°)	2.00
Angles dièdres (°)	25.0
Angles impropres (°)	2.12
Position dans le diagramme de Ramachandran (%)	
Favorables	83.1
Additionnelle	15.5
Généreuse	1.1
Interdite	0.3

#### V. Description de la structure de PBP3

Au cours de cette description, tous les résidus seront identifiés par le code à trois lettres suivi d'un numéro indiquant la position du résidu et par un suffixe correspondant à la structure dont il est question : -3 pour sPBP3\*, -5 pour sPBP5', -K pour K15, -2x pour PBP2x, ou -T pour TEM-1. Le tableau XIII pourra être utilisé pour faire le lien avec les résidus correspondants dans les autres structures. sPBP5' désigne une forme mutante de la

D,D-carboxypeptidase (D,D-CPase) d'*E. coli* dans laquelle le résidu glycine en position 105 est substitué par un aspartate.

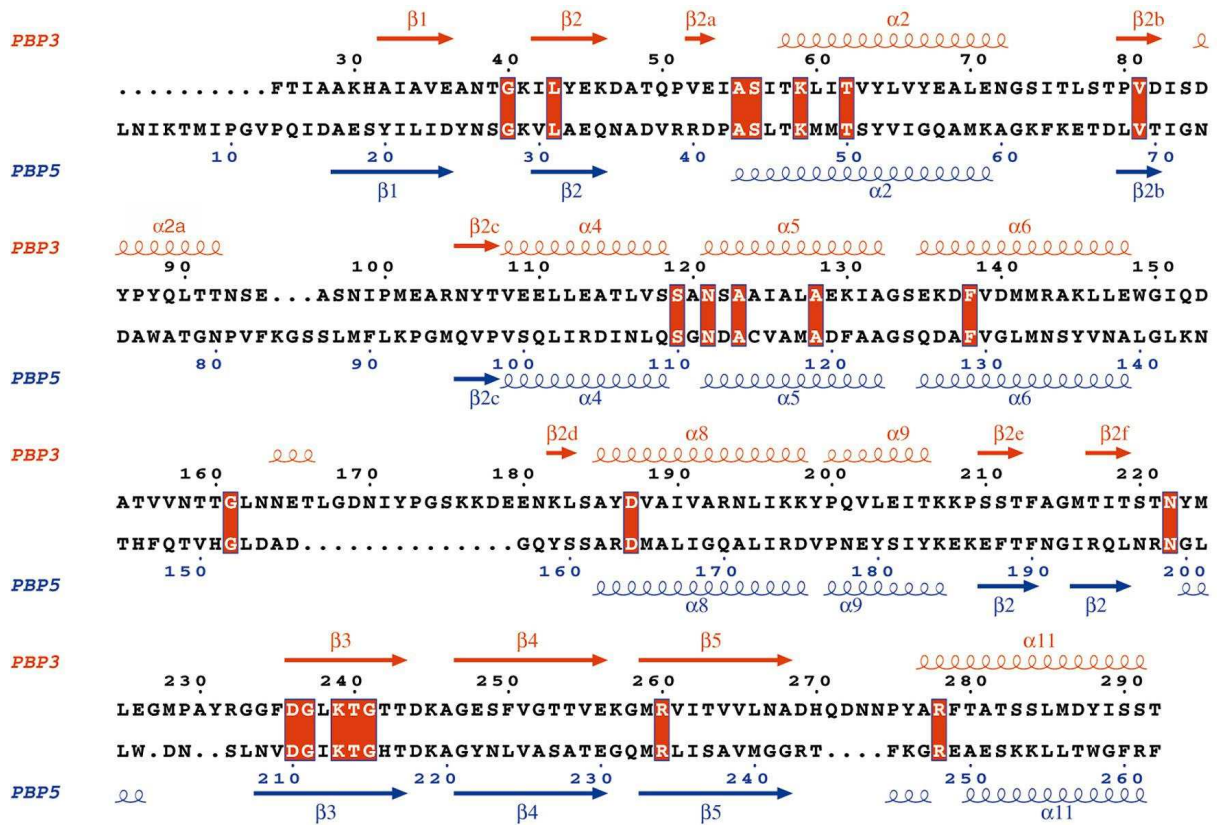
**Tableau XIII. Tableau de correspondance des acides aminés entre les structures de PBP3, PBP5, PBP2x, K15 et TEM-1.**

Nature et numéro du résidu					Position chez sPBP3*
PBP3	PBP5	PBP2x	K15	TEM-1	
Gly 40	Gly 28				Coude $\beta$ 1- $\beta$ 2
Leu 43	Leu 31				Brin $\beta$ 2
Ala 55	Ala 43				Bas de la cavité enzymatique
Ser 56	Ser 44	Ser 337	Ser 35	Ser 70	Bas de la cavité enzymatique, motif 1
Lys 59	Lys 47	Lys 340	Lys 38	Lys 73	Bas de la cavité, hélice $\alpha$ 2, motif 1
Thr 62	Thr 50				Bas de la cavité, hélice $\alpha$ 2
Val 81	Val 69				Brin $\beta$ 2b
Ser 119	Ser 110	Ser 395	Ser 96	Ser 130	Coude $\alpha$ 4- $\alpha$ 5, site actif, motif 2
Asn 121	Asn 112	Asn 397	Cys 98	Asn 132	N-terminal $\alpha$ 5, site actif, motif 2
Ala 123	Ala 114				Hélice $\alpha$ 5
Ala 128	Ala 119				Hélice $\alpha$ 5
Phe 138	Phe 129				Hélice $\alpha$ 6
Met 142	Met 133				Hélice $\alpha$ 6
Thr 160	His 151	Phe 450	Asp 143	Glu 166	Bas de la cavité enzymatique
Gly 161	Gly 152		Gly 211		Bas de la cavité enzymatique
Asn 163	Asp 154		Thr 153	Asn 170	Bas de la cavité enzymatique
Asp 187	Asp 164				Hélice $\alpha$ 8
Asn 222	Asn 199				
Asp 236	Asp 210				N-terminal brin $\beta$ 3
Gly 237	Gly 211				N-terminal brin $\beta$ 3
Lys 239	Lys 213	Lys 547	Lys 213	Lys 234	Brin $\beta$ 3, site actif, motif 3
Thr 240	Thr 214	Ser 548	Thr 214	Ser 235	Brin $\beta$ 3, site actif, motif 3
Gly 241	Gly 215	Gly 549	Gly 215	Gly 236	Brin $\beta$ 3, site actif, motif 3
Thr 243	Thr 217				Brin $\beta$ 3
Asp 244	Asp 218				Brin $\beta$ 3
Lys 245	Lys 217				Brin $\beta$ 3
Arg 260	Arg 234				Brin $\beta$ 5
Arg 278	Arg 248		Arg 248	Arg 244	Hélice $\alpha$ 11
O 26	O 130		O 336	O 323	Site actif
O 118	O 50	O 71	O 303	O 309	Site actif
	O 218		O 381	O 297	Site actif

Les résidus conservés au sein de la famille des D,D-CPases de type PBP5 sont surlignés de gris.

## V.1. Structure générale

La figure 7 représente l'alignement structural du domaine I de sPBP3\* et sPBP5' associé aux structures secondaires des deux protéines. La figure 8 donne une vue tridimensionnelle de l'arrangement des structures secondaires de sPBP3\* et sPBP5'.



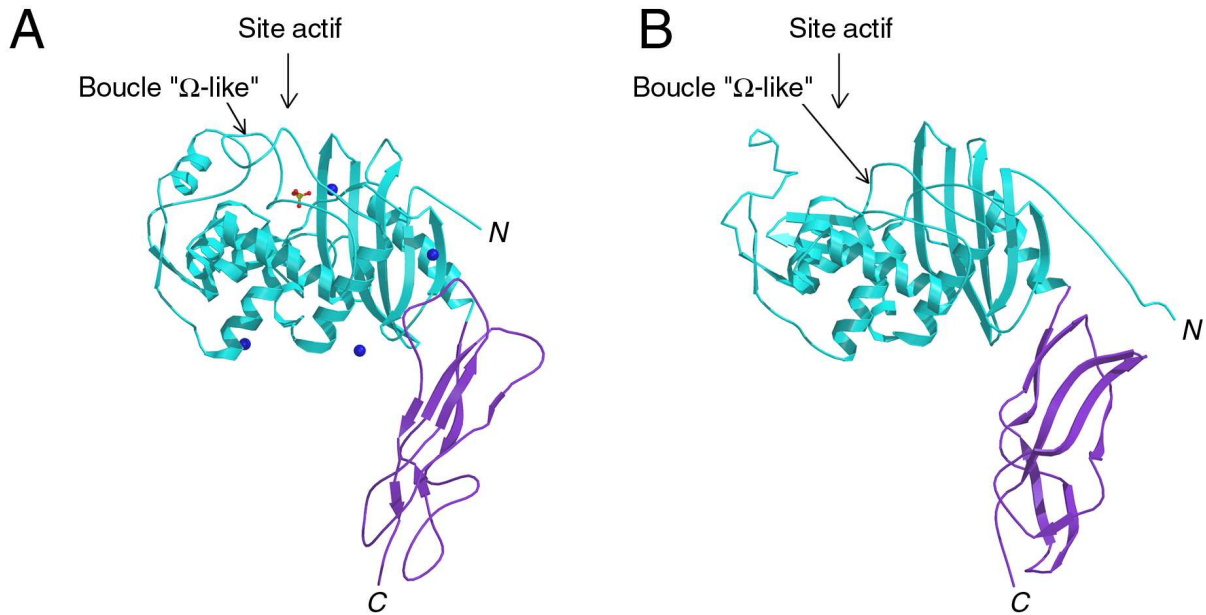
**Figure 7. Alignement de séquence associée aux structures secondaires du domaine I de sPBP3\* de *S. pneumoniae* et de sPBP5' d'*E. coli*.** Toutes les informations sont en rouge lorsqu'il s'agit de sPBP3\* et en bleu lorsqu'il s'agit de sPBP5'. Les acides aminés très conservés dans la famille des D,D-carboxypeptidases sont encadrés en rouge. Noter l'insertion de 14 résidus dans la boucle «  $\Omega$ -like » de sPBP3\* (résidus 156 à 181) par rapport à celle de sPBP5' (résidus 147 à 158). Cette Figure a été réalisée à l'aide du programme ESPrit.

sPBP3\* est divisée en deux domaines I et II orientés en angle droit et dont les limites ont été déterminées par comparaison avec la structure de sPBP5' d'*E. coli* :

- le domaine I N-terminal comprend les résidus 25 à 292, il est composé de 8 hélices  $\alpha$ , de 8 brins  $\beta$  et il contient le site actif de la protéine où sont présents les trois motifs conservés du site catalytique.
- le domaine II C-terminal, qui comprend les résidus 293 à 393, est constitué d'un sandwich de deux feuillets  $\beta$  anti-parallèles, l'un composé de 2 brins et l'autre de 3 brins.

L'extrémité amphiphile associée à la membrane est absente dans la forme cristallisée de PBP3 mais il est vraisemblable qu'elle se positionne à la base du domaine II et se déploie sur la surface externe de la membrane cytoplasmique.





**Figure 8. Topologie et structure de sPBP3\* de *S. pneumoniae* et de sPBP5' d'*E. coli*.** La région colorée en cyan correspond au domaine I N-terminal, celle colorée en violet au domaine II C-terminal. Le sulfate présent dans le site actif de sPBP3\* et les ions iodure en interaction avec la protéine sont représentés en « Ball-and-Stick ». Les ions sulfate portent les couleurs usuelles, les ions iodure sont colorés en bleu. Les extrémités N- et C-terminales sont indiquées. Dans cette vue, la membrane cytoplasmique se situe à la base des molécules. Cette figure a été réalisée à l'aide du programme Molscript.

## V.2. Symétrie non cristallographique

En raison de la grande flexibilité des structures secondaires observée dans le domaine C-terminal, la symétrie non-cristallographique n'a pas été utilisée au cours de l'affinement. Les quatre molécules ont donc évolué indépendamment les unes des autres. L'écart type sur l'ensemble des atomes du domaine I est de 0.57 Å, il est de 1.42 Å sur l'ensemble des atomes du domaine II. La différence la plus marquée entre les quatre molécules concerne donc le domaine II C-terminal. Les brins  $\beta$  sont mieux conservés que les boucles ou les coudes qui se sont différenciés. De plus, le désordre est présent dans cette partie de la structure, et la densité électronique des boucles et des coudes est souvent de faible qualité.

## V.3. Facteurs de température

Le facteur B moyen de la protéine est 29.5 Å<sup>2</sup> avec la répartition suivante :

- Molécule A : 26.1 Å<sup>2</sup>

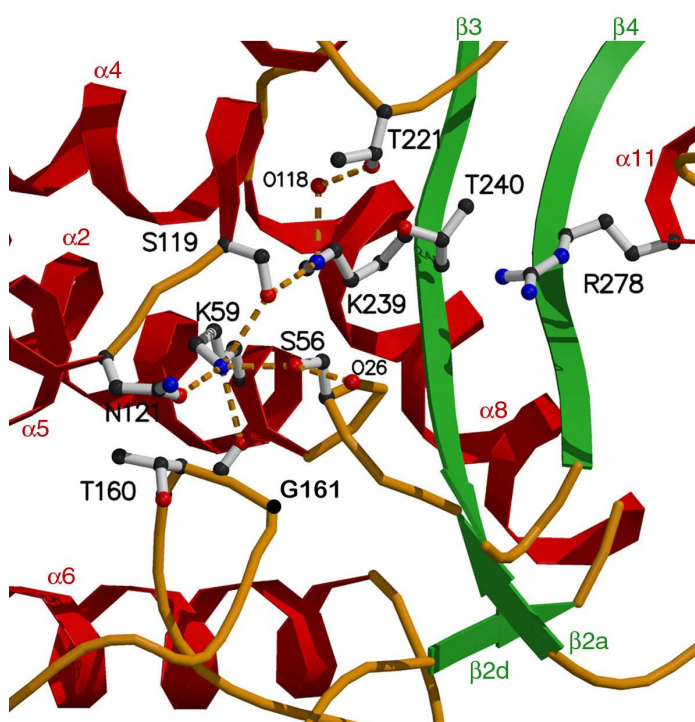
- Molécule B : 32.0 Å<sup>2</sup>
- Molécule C : 30.7 Å<sup>2</sup>
- Molécule D : 29.3 Å<sup>2</sup>

#### V.4. Description du site actif

Le site actif (Figure 9) est situé à la jonction entre un feuillet  $\beta$ , composé de 5 brins anti-parallèles formant un cœur hydrophobe ( $\beta3$ ,  $\beta4$ ,  $\beta5$ ,  $\beta1$ ,  $\beta2$ ), et un entrecroisement d'hélices  $\alpha$  ( $\alpha2$ ,  $\alpha4$ ,  $\alpha5$ ,  $\alpha6$  et  $\alpha8$ ). Son entrée est située à l'opposé de l'extrémité C-terminale de la protéine et il comprend les éléments architecturaux suivants :

- l'hélice  $\alpha2$  dont l'extrémité N-terminale porte la sérine active 56 et la Lys59-3 de la tétrade SxxK
- sur le coude entre les hélices  $\alpha4$  et  $\alpha5$  se trouvent les résidus Ser119-3 et Asn121-3 de la triade SxN
- le brin  $\beta3$  situé à l'extérieur du feuillet et porte les résidus Lys239-3, Thr240-3 et Gly241-3 de la triade K(S/T)G.

La Gly161-3 présente sur la grande boucle dans le fond de la cavité enzymatique possède un rôle structural important car elle permet de limiter l'encombrement du site catalytique. La Thr160-3 présente sur cette même boucle ainsi que l'Arg278-3 au départ de l'hélice  $\alpha11$  participent également au site actif.



**Figure 9. Architecture du site actif de sPBP3\*.** Les principaux résidus catalytiques du site actif et les molécules d'eau sont représentés en « Ball-and-Stick », les structures secondaires sont représentées en mode ruban. Les hélices sont colorées en rouge, les brins  $\beta$  en vert. Certaines liaisons hydrogène sont représentées en pointillés orange. Cette figure a été réalisée à l'aide du programme Molscript.

Le site actif présente un réseau complexe de liaisons hydrogènes. Le groupe  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys59-3 joue un rôle central dans ce réseau en formant des liaisons hydrogène avec le groupe hydroxyle de la Ser56-3 et de la Ser119-3, ainsi qu'avec le groupe carbonyle de la chaîne latérale de l'Asn121-3 et le groupe carbonyle porté par la chaîne principale de la Thr160-3 (Figure 9).

Deux molécules d'eau sont présentes dans le site actif. La première (O26-3) établit trois liaisons hydrogène avec le groupe hydroxyle de la Ser56-3 et la liaison amide portée par la chaîne principale des résidus Ser56-3 et Thr160-3. La deuxième (O118-3) établit deux liaisons hydrogène avec le groupe  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys239-3 et le groupe hydroxyle de la Thr221-3.

## **V.5. Homologie structurale entre sPBP3\*, sPBP5', K15, TEM-1, PBP2x et PBP2a**

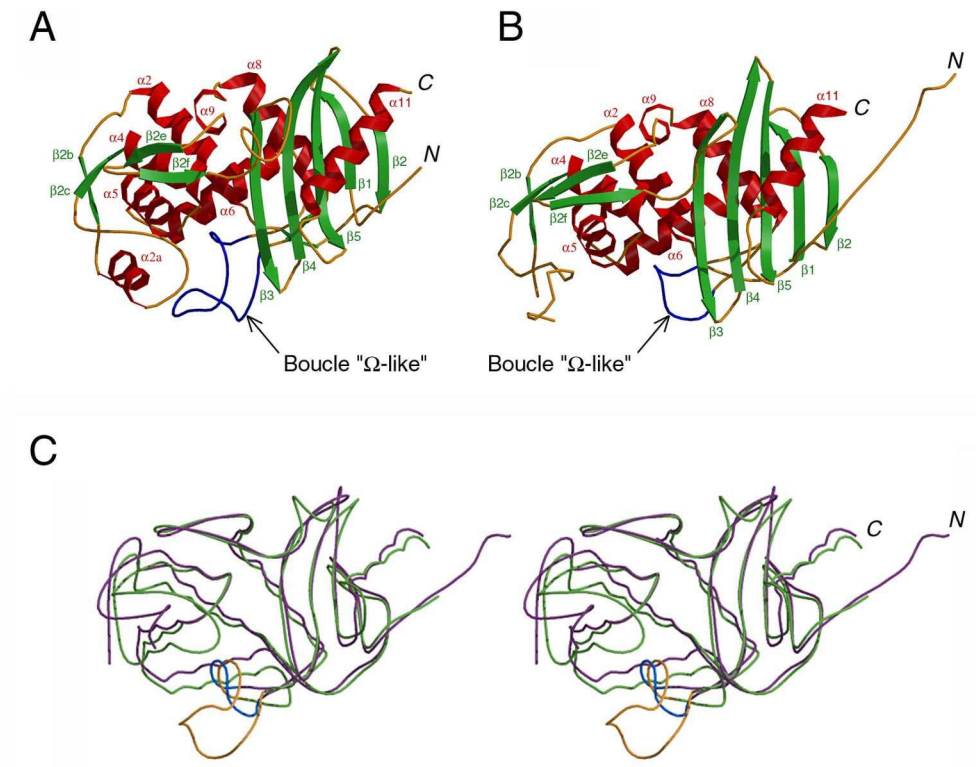
### **V.5.1. Comparaison des structures de sPBP3\* et sPBP5'**

#### **V.5.1.1. Domaine I N-terminal**

Les structures secondaires du domaine I portant les résidus catalytiques de sPBP3\* se superposent sur celles de sPBP5' avec une déviation RMS de 1.09 Å. L'extrême gauche et la partie basse du domaine I constituent les régions qui présentent le plus de variations conformationnelles avec deux différences majeures entre les deux CPases (Figure 10) :

- L'hélice  $\alpha$ 2a de sPBP3\* n'apparaît pas dans la structure du mutant sPBP5', la région correspondante est désordonnée. Il est possible que la charge négative introduite par la mutation Gly105Asp-5 déstabilise la structure dans cette région, entraînant la flexibilité apparente de cette dernière.
- La région comprise entre les résidus Val156-3 et Asn181-3 chez sPBP3\* et Phe147-5 et Asp157-5 chez sPBP5' correspond à la boucle « oméga » ( $\Omega$ ) des  $\beta$ -lactamases, elle sera appelée boucle «  $\Omega$ -like » chez les CPases. Bien que les extrémités N- et C-terminales de cette boucle se superposent relativement bien entre les deux enzymes, des différences très importantes peuvent être observées au niveau de son repliement général. La boucle «  $\Omega$ -like » de sPBP3\* présente une

insertion 14 résidus supplémentaires et apparaît donc plus étendue que celle de sPBP5'.

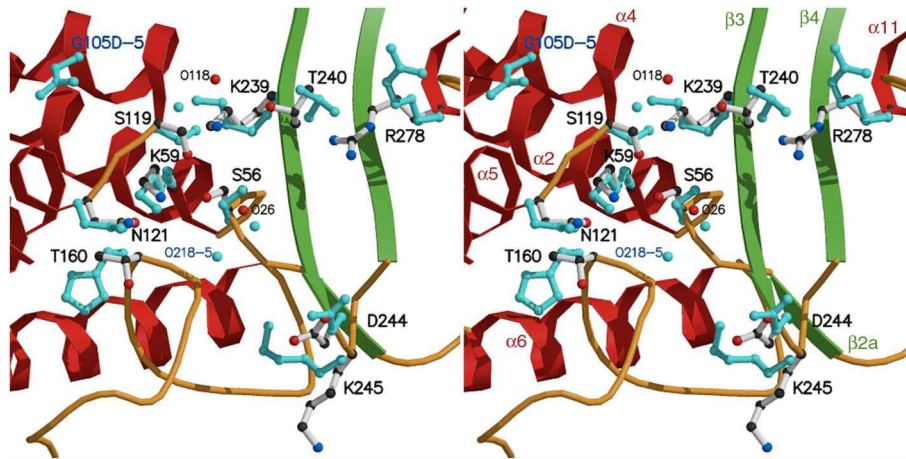


**Figure 10. Structure du domaine I de liaison à la pénicilline de sPBP3\* de *S. pneumoniae* et de sPBP5' d'*E. coli*.** A-B : Représentation en mode ruban du domaine I de sPBP3\* (A) et de sPBP5' (B). Les hélices sont colorées en rouge, les brins β en vert et la boucle « Ω-like » en bleu. C : Vue en stéréo de la superposition du domaine I de sPBP3\* et de sPBP5'. La structure de sPBP3\* est représenté en vert, celle de sPBP5' en violet. La boucle « Ω-like » est colorée en orange chez sPBP3\* et en bleu chez sPBP5'. Ces figures ont été réalisées à l'aide du programme Molscript.

### V.5.1.2. Comparaison du site actif

Bien que l'architecture du site actif de sPBP3\* et sPBP5' soit proche, des différences significatives peuvent être observées dans l'orientation des chaînes latérales des principaux résidus catalytiques (Figure 11) :

- L'orientation de la chaîne latérale de la Ser active est inversée.
- Une déviation de 90° est observée au niveau de la chaîne latérale de la Ser119-3 appartenant à la triade SxN et de la chaîne latérale de l'Arg278-3.
- Les chaînes latérales de la Lys239-3 et de la Thr240-3 de la triade KTG sont orientées différemment.



**Figure 11. Vue en stéréo de la superposition des sites actifs de sPBP3\* et de sPBP5'.** Les structures secondaires sont représentées en mode ruban, les hélices sont colorées en rouge, les brins  $\beta$  en vert. Les principaux résidus catalytique du site actif et les molécules d'eau sont représentés en « Ball-and-Stick ». Les résidus et les molécules d'eau de sPBP5' sont représentés en cyan, ceux de sPBP3\* sont colorés classiquement. Noter la différence d'orientation des chaînes latérales des résidus catalytiques et l'absence de la molécule d'eau O218-5 chez sPBP3\*. Cette figure a été réalisée à l'aide du programme Molscript.

La cavité enzymatique de sPBP5' présente donc une anomalie structurale, probablement due à la mutation Gly105Asp-5 localisée dans l'angle supérieur gauche du site catalytique (Figure 11).

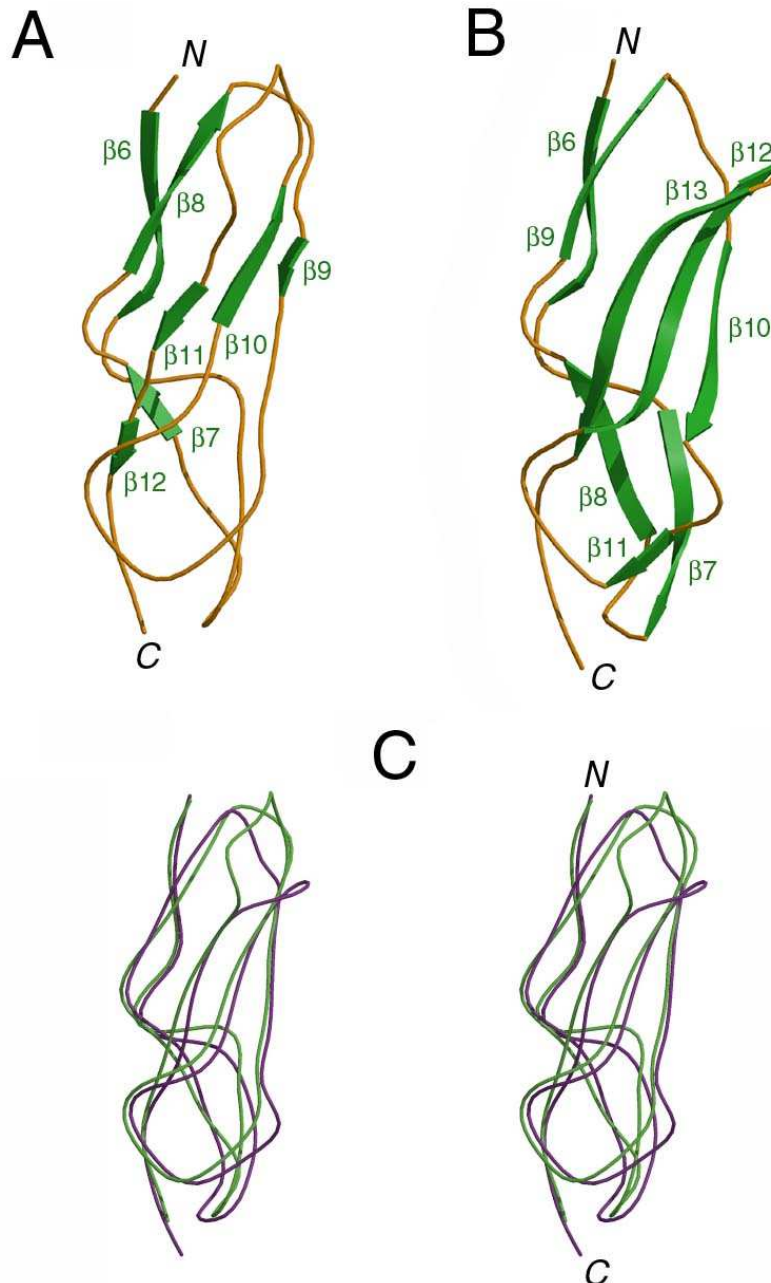
La Gly161-3 de sPBP3\* qui possède un rôle important dans la structure de la boucle présente dans le fond de la cavité enzymatique est conservée chez sPBP5', il s'agit de la Gly152-5. Les deux molécules d'eau présentes dans le site actif de sPBP3\* (O26-3 et O118-3) sont conservées dans celui de sPBP5'. Cette dernière possède une molécule d'eau supplémentaire (O218-5) près de l'hélice  $\alpha 2$ , sa position coïncide avec celle de la molécule d'eau impliquée dans le processus de désacylation chez les  $\beta$ -lactamases. Cette molécule d'eau chez sPBP5' établit une seule liaison hydrogène avec la molécule d'eau O130-5.

L'orientation des chaînes latérales des résidus Asp244-3 et Lys245-3 divergent entre sPBP3\* et sPBP5'. Chez PBP5, ces résidus sont importants pour la maintenance de la morphologie du bacille, il a été proposé qu'ils pourraient être impliqués dans la reconnaissance du substrat (Ghosh et Young, 2003).

### V.5.1.3. Domaine II C-terminal

Les structures secondaires du domaine II de sPBP3\* se superposent sur celles de sPBP5' avec une déviation RMS de 2.83 Å, le repliement de ce domaine est donc relativement différent entre les deux CPases. Le domaine I de sPBP5' est par ailleurs plus

structuré (Figures 12A et 12B), les brins  $\beta 7$  et  $\beta 9$  à  $\beta 12$  de sPBP3\* sont beaucoup plus courts que les brins  $\beta$  correspondants chez sPBP5'. Par ailleurs, la boucle comprise entre les brins  $\beta 10$  et  $\beta 11$  « ouvre » le domaine II de sPBP3\* qui apparaît de ce fait moins compact que celui de sPBP5'. L'introduction des coordonnées de sPBP3\* ou sPBP5' dans le programme DEJAVU (<http://portray.bmc.uu.se/cgi-bin/dennis/dejavu.pl>) n'a permis d'identifier aucun domaine structural connu homologue au domaine II.

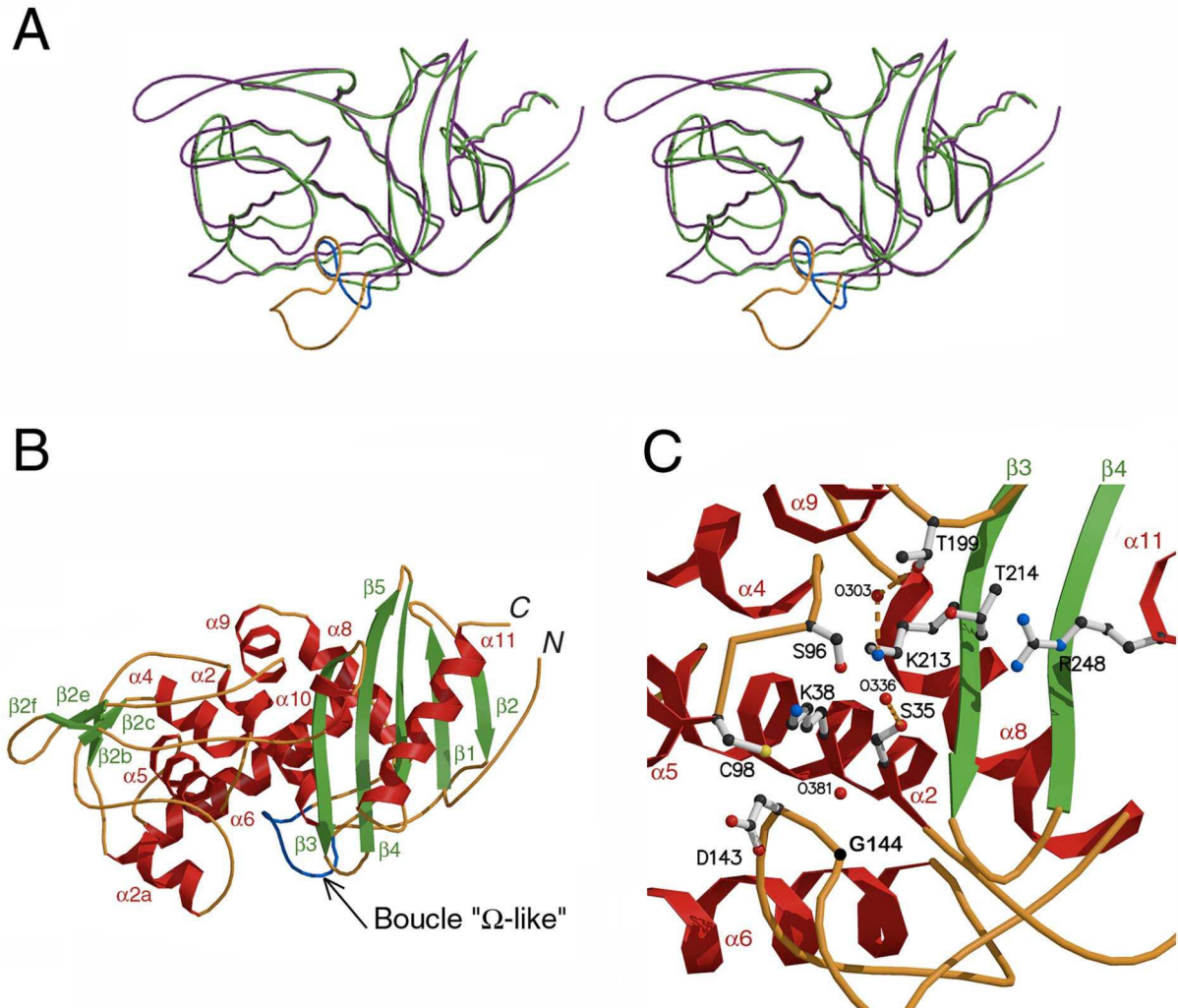


**Figure 12. Comparaison des domaines II C-terminaux de sPBP3\* et de sPBP5'.** A-B : Représentation en ruban du domaine II de sPBP3\* (A) et de sPBP5' (B). C : Vue en stéréo de la superposition des domaines II de sPBP3\* (en vert) et de sPBP5' (en violet). Ces figures ont été réalisées à l'aide du programme Molscrip.



### V.5.2. Comparaison des structures de PBP3 et K15

Les structures secondaires du domaine de liaison à la pénicilline (domaine I) de sPBP3\* et de la D,D-transpeptidase K15 (code PDB : 1SKF, (Fonze *et al.*, 1999)) se superposent avec une déviation RMS de 1.43 Å (Figure 13A). Cette valeur est de 1.54 Å pour la superposition du domaine de liaison à la pénicilline de sPBP5' et de K15.



**Figure 13. Comparaison de sPBP3\* de *S. pneumoniae* et de la D,D-transpeptidase de *Streptomyces* K15.**  
 A : Vue en stéréo de la superposition du domaine de liaison à la pénicilline de sPBP3\* et de K15. La structure de sPBP3\* est représentée en vert, celle de K15 en violet. La boucle « Ω-like » est colorée en orange chez sPBP3\* et en bleu chez K15. B : Représentation en mode ruban de K15. Les hélices sont colorées en rouge, les brins β en vert et la boucle « Ω-like » en bleu. C : Architecture du site actif de K15. Les principaux résidus catalytiques du site actif et les molécules d'eau sont représentés en « Ball-and-Stick », les structures secondaires sont représentées en mode ruban. Les hélices sont colorées en rouge, les brins β en vert. Certaines liaisons hydrogène sont représentées en pointillés orange. Ces figures ont été réalisées à l'aide du programme Molscript.

Le domaine de liaison à la pénicilline de K15 est très proche de celui de sPBP3\*. Les deux enzymes possèdent quasiment les mêmes structures secondaires, seuls les brins β2a et β2d de sPBP3\* sont absents chez K15 (Figure 13B). K15 possède également une hélice

supplémentaire,  $\alpha 10$ . Il est intéressant de noter que K15 possède la même boucle «  $\Omega$ -like » courte que sPBP5', la boucle «  $\Omega$ -like » de sPBP3\* est donc plus étendue que celle de K15.

Outre la présence d'une Cys (Cys98-K) chez K15 qui remplace l'Asn121-3 de sPBP3\*, l'architecture du site actif des deux enzymes est très similaire. Un équivalent de la Gly161-3 structurale est présent dans le site actif de K15, il s'agit de la Gly144-K. L'Arg en interaction avec le substrat chez sPBP3\* et sPBP5' (Arg278-3 ou Arg248-5) est également présente à la même position chez K15, il s'agit de l'Arg248-K. sPBP3\* possède sur le haut de son site actif la Thr221-3 qui établit une liaison hydrogène avec O118-3. On trouve une Thr (Thr199-K) à la même position chez K15 alors qu'il n'existe pas d'équivalent à ce résidu chez sPBP5'. La Thr199-K établit également une liaison avec la molécule d'eau O303-K, équivalente à O118-3. En revanche, à l'inverse de sPBP3\* mais comme sPBP5', K15 possède une molécule d'eau (O381-K) équivalente à la molécule O297-T de TEM-1 (Figure 13C). Enfin, une légère déviation de la chaîne latérale de la sérine catalytique est observée entre sPBP3\* (Ser56-3) et K15 (Ser35-K).

### V.5.3. Comparaison des structures de PBP3 et TEM-1

Les structures secondaires du domaine de liaison à la pénicilline (domaine I) de sPBP3\* et de la  $\beta$ -lactamase de classe A TEM-1 (code PDB : 1BTL, (Jelsch *et al.*, 1993)) se superposent avec une déviation RMS de 1.47 Å. Cette valeur est de 1.70 Å pour la superposition du domaine de liaison à la pénicilline de sPBP5' et de TEM-1.

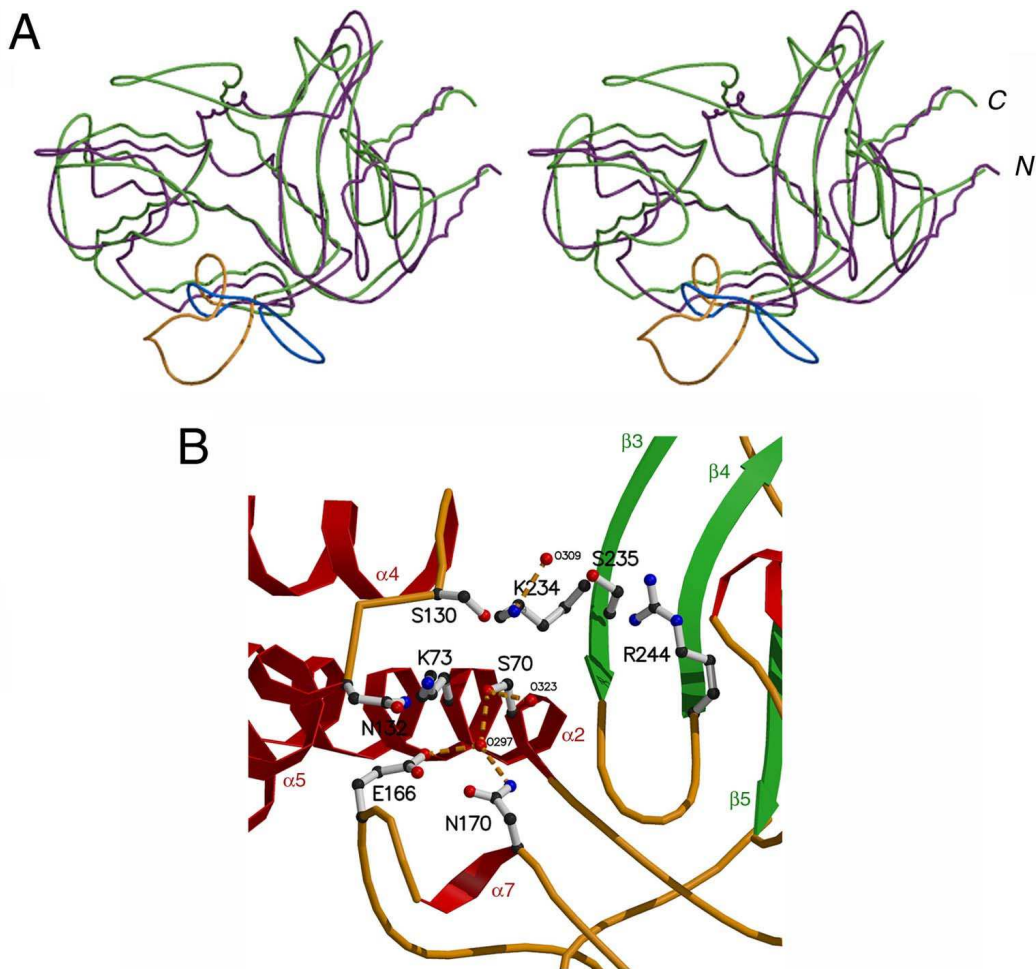
Le domaine de liaison à la pénicilline de sPBP3\* ressemble fortement à celui de TEM-1 (Figure 14A), les différences majeures observées entre les deux enzymes sont les suivantes :

- L'hélice N-terminale  $\alpha 1$  de TEM-1 est remplacée chez sPBP3\*, comme chez sPBP5', par une chaîne peptidique étendue.
- L'hélice  $\alpha 3$  de TEM-1 n'est pas présente chez sPBP3\*. Cette dernière possède en revanche, une dizaine de résidus en amont de la position de  $\alpha 3$ , l'hélice  $\alpha 2a$  qui est absente chez TEM-1.
- Les hélices  $\alpha 7$  et  $\alpha 10$  de TEM-1 ne sont pas présentes chez sPBP3\*.
- sPBP3\* possède six brins  $\beta$  supplémentaires par rapport à TEM-1. Les brins  $\beta$  communs aux deux enzymes constituent le feuillet  $\beta$  à 5 brins conservé au sein de la famille de protéines ASPRE.



- La boucle «  $\Omega$ -like » de sPBP3\* dévie largement de la boucle «  $\Omega$  » de TEM-1 (Figure 10B et 14A).
- Dans le fond de la cavité enzymatique, la structure de la grande boucle qui est conservée chez les PBPs diffère chez TEM-1. Chez les PBPs, cette boucle porte une Gly (Gly161-3) strictement conservée alors que ce résidu est absent chez TEM-1.

Les molécules d’eau O26-3 et O118-3 sont également présentes dans le site actif de TEM-1 (Figure 14B). Comme cela a été évoqué dans l’avant dernier paragraphe, sPBP3\* ne possède pas d’équivalent de la molécule d’eau activée (O297-T) par la Glu166-T chez TEM-1 et impliquée dans le processus de désacylation.



**Figure 14. Comparaison de sPBP3\* de *S. pneumoniae* et de la  $\beta$ -lactamase TEM-1 d'*E. coli*.** A : Vue en stéréo de la superposition du domaine de liaison à la pénicilline de sPBP3\* et de TEM-1. La structure de sPBP3\* est représentée en vert, celle de TEM-1 en violet. La boucle «  $\Omega$ -like » est colorée en orange chez sPBP3\* et en bleu chez TEM-1. B : Architecture du site actif de TEM-1. Les principaux résidus catalytiques du site actif et les molécules d’eau sont représentés en « Ball-and-Stick », les structures secondaires sont représentées en mode ruban. Les hélices sont colorées en rouge, les brins  $\beta$  en vert. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés orange. Ces figures ont été réalisées à l’aide du programme Molscript.

#### V.5.4. Comparaison des structures de PBP3 et PBP2x ou PBP2a

Les structures secondaires du domaine de liaison à la pénicilline de sPBP3\* et de PBP2x de *S. pneumoniae* (code PDB : 1PMD, (Pares *et al.*, 1996)) se superposent avec une déviation RMS de 3.36 Å. Cette valeur est de 3.14 Å pour la superposition du domaine de liaison à la pénicilline de sPBP3\* et de PBP2a de *Staphylococcus aureus* (code PDB : 1MWR, (Lim et Strynadka, 2002)). Si les éléments de structures secondaires qui portent les résidus catalytiques se superposent relativement bien entre sPBP3\* et PBP2x ou PBP2a, toutes les autres régions présentent des déviations importantes (Figure 15). L'orientation des chaînes latérales des résidus catalytiques est quant à elle conservée entre les trois enzymes et on retrouve la Gly structurale équivalente à Gly161-3 dans le fond de la cavité enzymatique. Aucune Arg équivalente à Arg278-3, résidu en interaction avec le substrat, n'est présente chez PBP2x ou chez PBP2a, il semblerait donc que ce résidu ne soit pas important pour la fonction des PBPs de classe B.

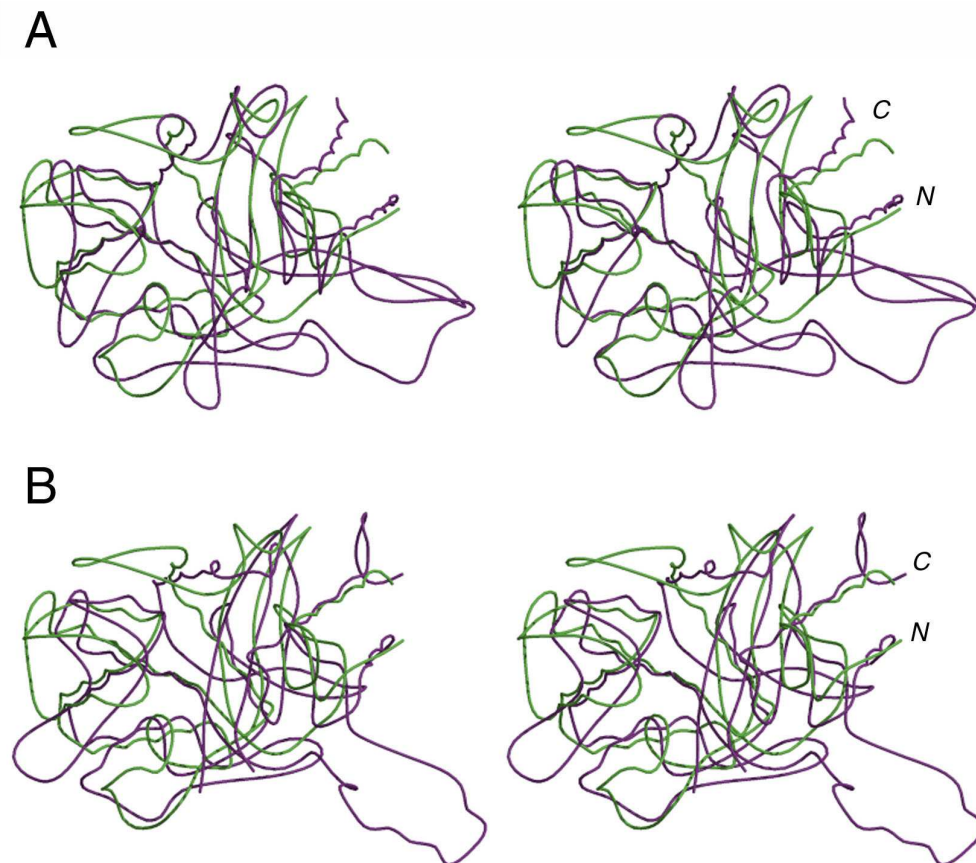


Figure 15. Vue en stéréo de la superposition du domaine de liaison à la pénicilline de sPBP3\* et de PBP2x de *S. pneumoniae* (A), et de sPBP3\* et de PBP2a de *S. aureus* (B). La structure de sPBP3\* est représentée en vert, celle de PBP2x ou de PBP2a en violet. Ces figures ont été réalisées à l'aide du programme Molscript.

## **V.6. Comparaison de différentes « D,D-carboxypeptidases de type PBP5 »**

### **V.6.1. Définition des « D,D-carboxypeptidases de type PBP5 »**

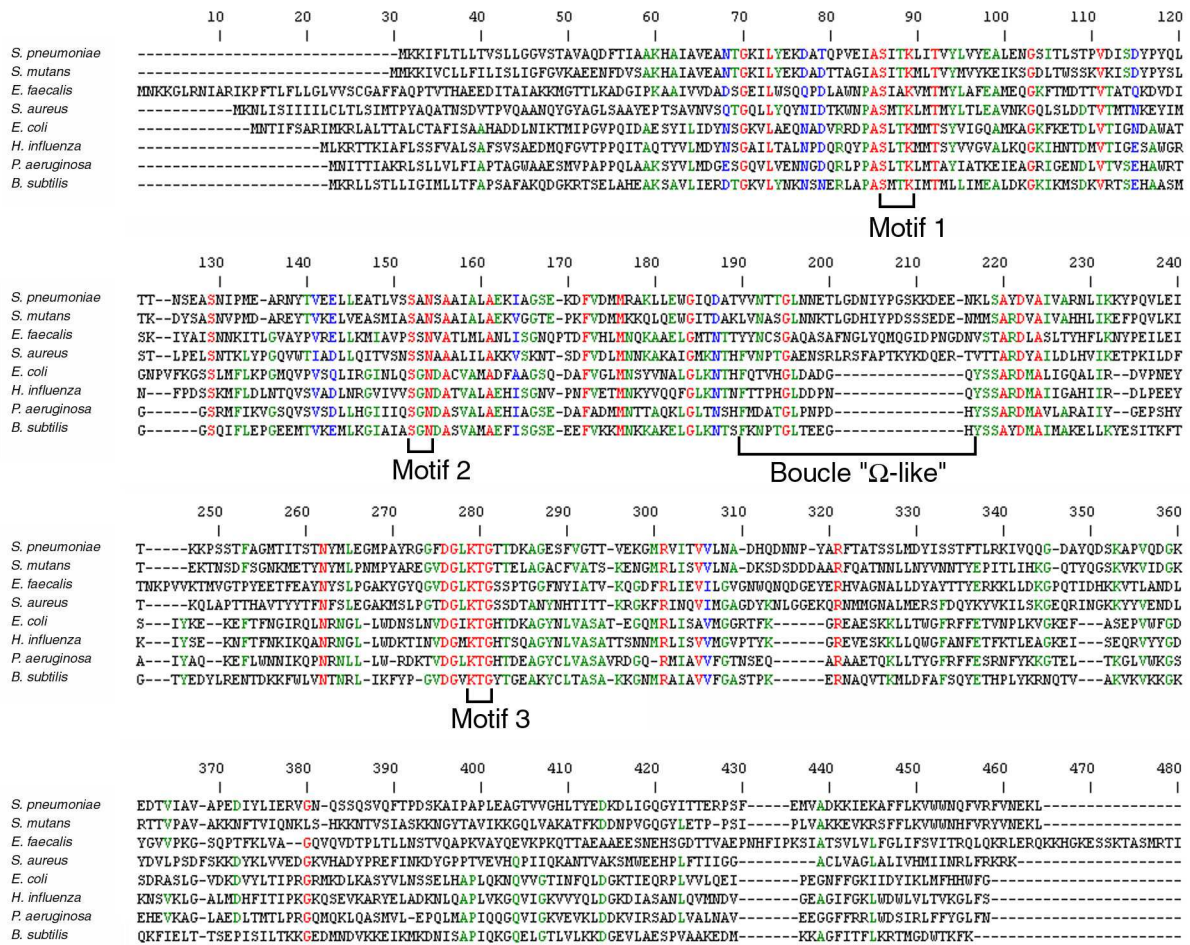
Un certain nombre de différences structurales distinguent sPBP3\* de sPBP5'. Nous avons donc cherché à compléter nos observations structurales par une comparaison des séquences primaires de PBP3, PBP5 et de leur homologues potentiels chez différentes espèces bactériennes. Afin de simplifier notre étude, nous avons défini une sous-famille de protéines que nous avons appelées « D,D-carboxypeptidases de type PBP5 ». Cette sous-famille comprend les protéines possédant une activité CPase, avérée ou potentielle, et pour lesquelles une topologie équivalente à celle de PBP3 ou PBP5 a été prédite. Les D,D-CPases de type PBP5 possèdent toutes un peptide signal, un domaine de liaison à la pénicilline, une extension C-terminale d'une centaine de résidus (de la taille du domaine II) et une hélice amphiphile à l'extrémité C-terminale. Un certain nombre d'acides aminés sont conservés chez les D,D-CPases de type PBP5, les résidus équivalents chez PBP3 et PBP5 sont indiqués dans le tableau XIII par une coloration grise. Au cours de notre recherche, nous avons constaté que certaines D,D-CPases de type PBP5 possèdent également un ou plusieurs segments C-terminaux d'ancrage à la membrane.

### **V.6.2. Identification de deux groupes de D,D-carboxypeptidases de type PBP5**

Dans les différents peptidoglycanes (PGs) dont la structure chimique a été déterminée, les chaînes peptidiques portent soit un diaminopimélate soit une lysine en troisième position. Il s'agit d'un méso-2,6-diaminopimélate chez *E. coli*, dont est issue PBP5, et d'une lysine chez *S. pneumoniae* dont est issue PBP3. Nous avons cherché à déterminer si une relation pouvait être établie entre certaines des caractéristiques structurales de sPBP3\* ou sPBP5' et la nature du résidu en troisième position des chaînes peptidiques du PG.

Nous avons recherché dans les banques de données toutes les protéines présentant une identité de séquence avec PBP3. Jusqu'en 2003, 121 génomes bactériens ont été séquencés dont 48 appartiennent à des espèces différentes. Chaque espèce bactérienne compte une à quatre CPases de type PBP5. Sauf dans le cas d'*E. coli*, nous ne disposons d'aucune information sur la présence et la fonction des différences D,D-CPases dans une espèce bactérienne. Nous avons donc procédé à l'alignement des séquences primaires des D,D-

CPases de type PBP5 uniques. De cette analyse ressort deux groupes distincts de CPases de type PBP5 qui se différencient par le nombre de résidus présents dans la région de la boucle « Ω-like ». Nous avons alors sélectionné huit de ces CPases de type PBP5 en provenance de bactéries dont la structure du PG a été déterminée. Quatre d'entre elles proviennent d'*E. coli*, *Haemophilus influenza*, *B. subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa* chez lesquelles le PG possède un diaminopimélate en troisième position en provenance de *S. pneumoniae* R6, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* chez lesquelles les chaînes peptidiques du PG possèdent une lysine en troisième position.



Nous avons procédé à l'alignement des 8 séquences primaires (Figure 16) et constaté que les CPases de type PBP5 issues de bactéries dont le PG possède un diaminopimélate sont caractérisées, comme PBP5, par une boucle «  $\Omega$ -like » courte. La séquence primaire des protéines, parmi lesquelles PBP3, provenant de microorganismes dont le PG possède une lysine présentent plusieurs zones d'insertions d'acides aminés (régions 201-215, 304-309 et 349-351). La plus importante est située au niveau de la boucle «  $\Omega$ -like » (région 201-215) au niveau de laquelle une insertion d'une quinzaine de résidus est observée. En revanche, aucune classification n'a pu être opérée sur la base du type de Gram (négatif ou positif) ou de la morphologie (coque ou bacille) de la bactérie.

## VI. Discussion

La résolution de la structure d'une forme soluble de la D,D-CPase sauvage de *S. pneumoniae* nous procure des données indispensables à la compréhension de la fonction de PBP3 dans la division du pneumocoque. Par ailleurs, elle nous donne l'opportunité de comparer la structure de deux D,D-CPases homologues appartenant à deux types bactériens différents : un bacille à Gram négatif, *E. coli*, et un coque à Gram positif, *S. pneumoniae*.

### VI.1. Fonction catalytique du domaine I

Une superposition des sites actifs de sPBP3\*, sPBP5', K15, TEM-1, PBP2x et PBP2a montre que l'orientation des chaînes latérales des principaux résidus catalytiques est identique dans toutes les structures sauf dans celle de sPBP5'. En fait, toutes les chaînes latérales déformées chez sPBP5' semblent se détourner de la charge négative portée par l'Asp105-5 qui a été substitué à la Gly de la forme sauvage de PBP5. Aucune activité D,D-CPase n'a pu être détectée chez le mutant sPBP5' qui est par ailleurs déficient en activité de désacylation (Amanuma et Strominger, 1984; Matsushashi *et al.*, 1979), le site actif de cette protéine n'est donc pas fonctionnel. Bien que nous n'ayons pas réalisé de test d'activité CPase sur sPBP3\*, le test de fonctionnalité réalisé à l'aide du pseudo-substrat S2d est positif (Tableau III) et la structure de son site actif est comparable à celle de K15, TEM-1, PBP2x et PBP2a. L'analyse



structurale de la fonction catalytique des CPases basée sur la structure de sPBP3\* est donc plus réaliste que celle réalisée précédemment par les auteurs de la structure de sPBP5'.

### VI.1.1. Acylation de PBP3 par les $\beta$ -lactamines et les substrats peptidiques

PBP3 et PBP5 appartiennent à une famille de protéase à sérine qui a été étudiée intensivement. Si la fonction catalytique de formation puis de désacylation d'un intermédiaire acyl-enzyme leur est commune, les différentes sous-classes de cette famille ont toutefois développé des mécanismes réactionnels très différents.

La réaction d'acylation comprend quatre étapes : la formation du complexe non-covalent, l'attaque nucléophile, la formation d'un intermédiaire tétrahédrique puis du complexe acyl-enzyme.

#### VI.1.1.1. Acylation par les $\beta$ -lactamines

Le complexe non-covalent serait stabilisé par une interaction entre le groupe carboxylate de l'antibiotique et les chaînes latérales des résidus Thr240-3 et Arg278-3. Les groupes amides portés par la chaîne principale des résidus Thr242-3 et Ser56-3 interagissent avec le groupe carbonyle de l'antibiotique.

Une analyse récente a été effectuée qui compare les différents mécanismes d'acylation par les  $\beta$ -lactamines proposés pour PBP2x de *S. pneumoniae*, la  $\beta$ -lactamase TEM-1 d'*E. coli* et la D,D-transpeptidase de *Streptomyces* K15 (Oliva *et al.*, 2003). L'architecture du site actif de sPBP3\*, dans lequel la distance entre les groupes hydroxyle des Ser56-3 et Ser119-3 ne dépasse pas 3 Å, autorise 3 des modèles proposés. Dans le premier modèle, le groupe carboxylate des  $\beta$ -lactamines extrait le proton du groupe hydroxyle de la Ser119-3 qui activerait alors le groupe hydroxyle de la Ser56-3 pour former la liaison ester. Cette étape serait suivie de la protonation de l'azote de l'intermédiaire tétraédrique par le groupe carboxyle, entraînant la rupture du cycle  $\beta$ -lactame (Diaz *et al.*, 2001).

Le deuxième modèle consiste en un mécanisme concerté impliquant la Ser56-3 et la Ser119-3. L'hydrogène de la Ser119-3 est transféré sur l'azote du cycle  $\beta$ -lactame tandis que l'hydrogène de la Ser56-3 se dirige vers la Ser119-3. De manière concomitante, la Ser56-3 réalise l'attaque nucléophile du groupe carbonyle du cycle  $\beta$ -lactame. Dans une variante de ce

modèle, la Ser119-3 serait remplacée par une molécule d'eau qui pourrait être O26-3 chez sPBP3\* (wolfe *et al.*, 1994).

En ce qui concerne la Lys239-3, le grand nombre de liaisons hydrogène établies par son groupe  $\epsilon$ -aminé avec ses voisins indique une forte implication du résidu dans le site actif. Par analogie avec TEM-1, la charge positive de cette Lys serait cruciale pour la formation du complexe acyl-enzyme (Lenfant *et al.*, 1991). Chez PBP5, la substitution du résidu équivalent à la Lys239-3 en Arg supprime l'activité CPase alors qu'elle n'a pas d'effet sur la liaison à la pénicilline et l'hydrolyse de l'antibiotique (Malhotra et Nicholas, 1992). Cette Lys pourrait donc n'avoir qu'un rôle de maintien de la charge électrique et de l'architecture du site actif chez les D,D-CPases de type PBP5. Sa mutation en Arg déformerait très faiblement la géométrie du site actif, diminuant l'affinité de ce dernier pour le substrat peptidique mais sans conséquence sur la liaison aux antibiotiques qui se fait certainement sur un site moins volumineux (Davies *et al.*, 2001).

#### **VI.1.1.2. Acylation par le substrat peptidique**

Il est admis que le mécanisme d'acylation des PBPs par les  $\beta$ -lactamines est identique au mécanisme d'acylation des PBPs par le substrat peptidique. Toutefois, lorsque l'on modélise le positionnement d'un disaccharide pentapeptidique dans le site actif de sPBP3\*, le groupe hydroxyle de la Ser119-3 se situe à 3.94 Å de l'azote de la liaison peptidique D-Alanyl-D-Alanine. Cette distance est trop importante pour un transfert de proton et suggère que seuls les deux derniers modèles décrits précédemment s'appliquent à la réaction d'acylation de sPBP3\* par le substrat peptidique. Dans ces deux modèles qui proposent une action concertée des résidus catalytiques, la Ser56-3 débiterait l'attaque nucléophile dès la perte de son proton. Cette attaque provoquerait une rotation de la chaîne peptidique, rapprochant suffisamment l'azote de la liaison peptidique D-Alanyl-D-Alanine de l'hydroxyle de la Ser119-3 pour permettre le transfert de proton.

Quelques interactions supplémentaires sont par ailleurs permises par la grande taille du substrat peptidique. Par exemple, le groupe carboxylate de la chaîne latérale de l'Asp244-3 pourrait interagir avec le substrat peptidique en établissant une liaison hydrogène avec l'azote porté par la chaîne principale de la glutamine en deuxième position. Le groupe aminé de la Lys245-3 pourrait quant à lui établir une liaison hydrogène avec le groupe carbonyle du L-Ala en première position du substrat peptidique.

### VI.1.2. Hydrolyse du complexe acyl-enzyme

Si l'étape d'acylation est identique pour les  $\beta$ -lactamines et le substrat peptidique, il n'en est pas de même pour l'étape d'hydrolyse du complexe acyl-enzyme.

#### VI.1.2.1. Hydrolyse du complexe formé par PBP3 et la $\beta$ -lactamine

Chez les  $\beta$ -lactamases de classe A, la boucle «  $\Omega$  » porte deux résidus conservés fortement impliqués dans la désacylation du complexe acyl-enzyme, réaction très rapide chez cette famille de protéines (Guillaume *et al.*, 1997; Lewis *et al.*, 1997). Chez TEM-1, il s'agit du Glu166-T et de l'Asn170-T qui positionnent une molécule d'eau (O297-T) près du complexe acyl-enzyme (Figure 14B). Activée par le Glu166-T, elle attaquerait la liaison ester de l'acyl-enzyme (Adachi *et al.*, 1991; Strynadka *et al.*, 1992).

Chez sPBP3\*, les résidus potentiellement équivalents à la Glu166-T et l'Asn170-T seraient respectivement la Thr160-3 et l'Asn164-3 mais l'orientation de leurs chaînes latérales, opposées à celles de Glu166-T et Asn170-T, ne permettent pas de positionner une molécule d'eau équivalente à O297-T. L'absence de cette molécule d'eau ainsi que la forme de la boucle «  $\Omega$ -like » de sPBP3\* sont certainement à l'origine de sa très faible vitesse de désacylation.

La plus forte efficacité de désacylation observée chez PBP5 et K15 (Tableau II) peut probablement s'expliquer par la forme de leur boucle «  $\Omega$ -like », qui se rapproche davantage de celle de TEM-1, et par la présence d'une molécule d'eau équivalente à O297-T, O218-5 chez sPBP5' (Figure 11) et O381-K chez K15 (Figure 13). O218-5 et O381-K ne sont toutefois activées par aucun résidu, d'où la différence dans leur faible capacité de désacylation du complexe antibiotique-enzyme par rapport à TEM-1.

Dans le cas d'un complexe acyl-enzyme entre sPBP3\* et une  $\beta$ -lactamine, le groupe carboxylate de l'antibiotique reste lié au complexe. La présence du groupe carboxylate restreint l'accessibilité d'une molécule d'eau à la liaison ester formée entre la protéine et l'antibiotique, or cette molécule d'eau est nécessaire à l'hydrolyse du complexe-acyl enzyme.



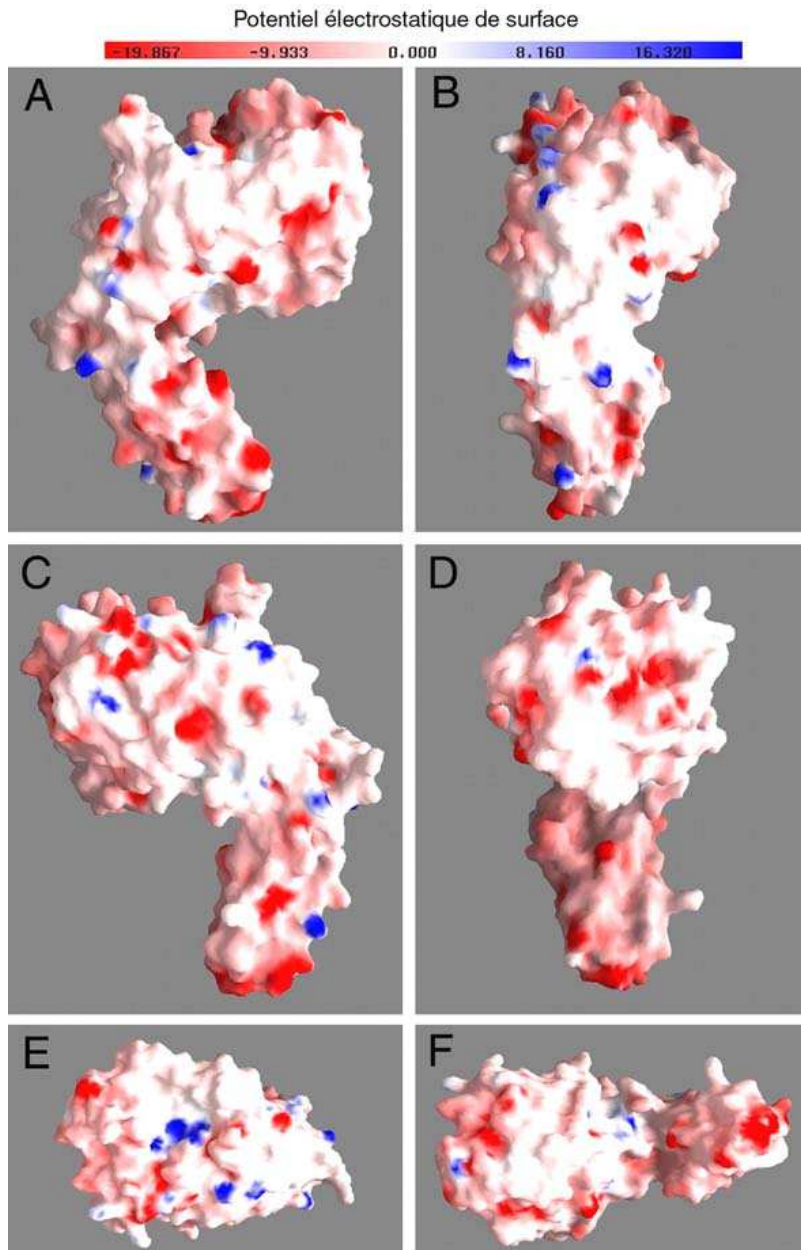
### VI.1.2.2. Hydrolyse du complexe formé par PBP3 et le substrat peptidique

La contrainte stérique imposée par le groupe carboxylate des  $\beta$ -lactamines n'existe pas dans le cas d'une interaction entre PBP3 et un substrat peptidique. En effet, la formation du complexe acyl-enzyme s'accompagne du départ du dernier résidu D-Ala qui porte le groupe carboxylate. Ce dernier n'est donc plus présent dans le site actif de l'enzyme acylée et la liaison ester de l'acyl-enzyme est alors accessible à une molécule d'eau. Il est donc très probable que la faible vitesse de désacylation observée dans le cas d'un complexe  $\beta$ -lactamine-PBP3 ne reflète pas la réaction de désacylation d'un complexe peptide-PBP3. La vitesse de désacylation d'un complexe peptide-PBP3 est certainement beaucoup plus rapide.

## VI.2. Le domaine II

L'analyse de l'interface entre le domaine I et le domaine II ([www.biochem.ucl.ac.uk](http://www.biochem.ucl.ac.uk)) indique une surface d'interaction d'environ 800 Å<sup>2</sup>, 6 liaisons hydrogène sont par ailleurs établies entre les deux domaines. Ces valeurs sont de l'ordre de grandeur de celles d'une interaction anticorps-antigène, elles ne laissent donc présager qu'une faible mobilité entre les deux domaines. La structure de sPBP3\* reflète cette absence de flexibilité car l'angle entre le domaine I et le domaine II ne varie pas plus de 1° entre les 4 molécules de l'unité asymétrique.

Il a été proposé que le domaine II pourrait établir des interactions avec des protéines impliquées dans la croissance ou la division bactérienne (Davies *et al.*, 2001). La faible conservation des acides aminés du domaine II chez les D,D-CPases de type PBP5 n'est pas en faveur de telles interactions (Figure 16). Par ailleurs, la répartition du potentiel électrostatique (Figure 17A à D) et des zones hydrophobes dans le domaine II, semble peu propice à des interactions avec d'autres protéines. Seule la base du domaine II a une large zone chargée négativement (Figure 17F). Sa position n'est pas favorable à une interaction avec des domaines protéiques périplasmiques mais elle est en revanche idéale pour une interaction avec des domaines protéiques membranaires.



**Figure 17. Potentiel électrostatique de surface de sPBP3\*.** L'échelle de couleur symbolisant la valeur du potentiel électrostatique est indiquée. Les zones colorées en rouge sont chargées négativement, celles en bleu sont chargées positivement. A-D : Quatre rotations successives de 90° autour de l'axe principal de sPBP3\* ont été effectuées pour obtenir les quatre vues latérales de la molécule. E : sPBP3\* vue de dessus, le site actif chargé positivement est apparent. F : sPBP3\* vue de dessous, noter la zone chargée négativement à la base du domaine II. Cette figure a été réalisée à l'aide du programme Grasp.

### VI.3. Rôle de la boucle « $\Omega$ -like »

Nous avons montré qu'il existait une relation entre la taille de la boucle «  $\Omega$ -like » des D,D-CPases de type PBP5 et la nature du résidu en troisième position des chaînes peptidiques du PG. Cette donnée est vérifiée chez la D,D-transpeptidase K15. En effet, cette dernière possède une boucle «  $\Omega$ -like » courte, présentant le même repliement que celle de sPBP5\*, et son substrat naturel, les chaînes pentapeptidiques du PG de *Streptomyces* K15, porte un L,L-diaminopimélate en troisième position. Cette boucle, située dans le bas de la cavité enzymatique, pourrait être impliquée dans la reconnaissance du substrat.

#### **VI.4. Evolution des D,D-carboxypeptidases de type PBP5, des $\beta$ -lactamases de classe A et de la D,D-transpeptidase K15**

La structure tridimensionnelle du domaine de liaison à la pénicilline des D,D-CPases de type PBP5 est très proche de celle de la D,D-transpeptidase K15. Ceci laisse à penser que ces deux types de protéine auraient peu évolué à partir d'un ancêtre commun pour se spécialiser dans la transpeptidation pour l'un et dans l'activité CPase pour l'autre.

La ressemblance entre les CPases de type PBP5 et les  $\beta$ -lactamases de classe A suggère que ces dernières aient évolué directement à partir de ce même ancêtre. La substitution de deux résidus dans la boucle «  $\Omega$ -like » (Glu166-T et Asn170-T) et le remodelage restreint de la cavité enzymatique auraient permis d'orienter la spécificité des  $\beta$ -lactamases vers les antibiotiques à la place du substrat peptidique. Le repliement de la boucle «  $\Omega$ -like » de sPBP3\* confère à cette CPase une moindre ressemblance avec les  $\beta$ -lactamases de classe A. Cette divergence structurale pourrait-elle expliquer en partie le fait que le pneumocoque n'ait pas développé un système de résistance aux  $\beta$ -lactamines basé sur la production de  $\beta$ -lactamases ? Les modifications nécessaires auraient peut-être été trop nombreuses pour permettre l'apparition de  $\beta$ -lactamases. Le pneumocoque étant par ailleurs naturellement compétent, l'acquisition de marqueurs de résistance par intégration de matériel génétique hexogène aurait constitué une alternative mieux adaptée.

#### **VI.5. Fonction biologique de PBP3**

##### **VI.5.1. Quel est ou quels sont le ou les substrat(s) de PBP3 ?**

##### **VI.5.1.1. Le lipide II, les précurseurs polysaccharidiques du peptidoglycane et le peptidoglycane pré-existant**

PBP3 est une D,D-CPase qui exerce son activité sur les chaînes pentapeptidiques du PG. Ces dernières sont présentes, bien que rarement, dans le PG mature qui constitue donc un substrat potentiel de PBP3. Le lipide II, précurseur membranaire du PG porte également des chaînes pentapeptidiques, il est lui aussi une cible potentielle de PBP3. Par ailleurs, si l'on admet l'hypothèse selon laquelle les unités disaccharide-pentapeptide sont polymérisées sous la forme de chaînes polysaccharidiques précurseurs avant d'être incorporées par

transpeptidation dans le PG pré-existant, alors ces dernières portent des pentapeptides et constituent également des cibles potentielles de PBP3 (Figure 19 A à D).

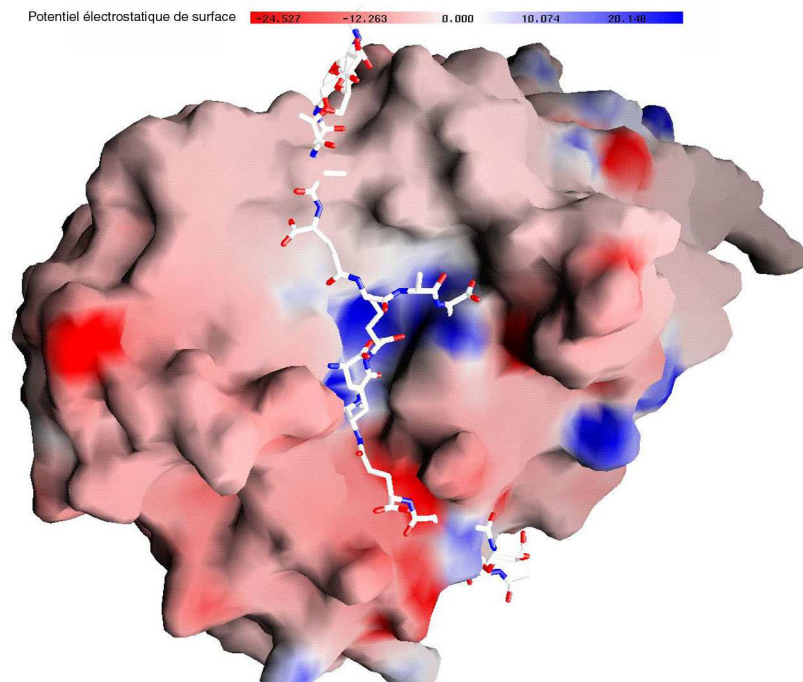
Les résultats obtenus au cours des travaux présentés dans la publication n°II nous permettent d'émettre quelques hypothèses concernant le(s) substrat(s) potentiels de PBP3. Ces travaux suggèrent que PBP3 aurait un rôle dans le positionnement des sites de néo-synthèse du PG. Elle exercerait son activité D,D-CPase sur l'ensemble de la surface cellulaire excepté dans la région avoisinant le site de division qui deviendrait de ce fait la seule zone fonctionnelle en termes d'incorporation de néo-PG. Nous ne disposons d'aucune donnée expérimentale nous indiquant si cette partition du PG en zones fonctionnelles et inertes nécessite que PBP3 agisse sur tous ou sur un seul de ses substrats potentiels présentés dans le paragraphe précédent.

Le PG pré-existant qui est présent sur toute la surface cellulaire constitue la cible la plus probable de PBP3. Il semblerait que du lipide II soit également présent sur l'ensemble de la cellule, puisqu'en l'absence de PBP3, des septa sont initiés ailleurs qu'au site de division (Schuster *et al.*, 1990). Il est possible que PBP3 ait à agir également sur ce substrat-ci pour restreindre la synthèse de néo-PG au site de division. Enfin, des précurseurs polysaccharidiques peuvent être polymérisés dès lors que du lipide II est disponible. Par conséquent, les précurseurs polysaccharidiques peuvent être eux aussi la cible de PBP3 au début du cycle cellulaire.

Lorsque les cellules se divisent, PBP3 se concentre vers les zones de néo-synthèse du PG, probablement pour réguler la phase de réticulation du néo-PG. Les hypothèses énoncées précédemment sur les substrats potentiels de la CPase restent identiques au cours de cette phase de synthèse.

#### **VI.5.1.2. Pentapeptides monomériques ou acétylés**

Certains des pentapeptides présents dans le PG de *S. pneumoniae* sont monomériques mais d'autres peuvent être liés, via le groupe  $\epsilon$ -aminé de la Lys, à une autre chaîne tri ou tétrapeptidique (Severin *et al.*, 1992; Severin *et al.*, 1997). L'architecture du site actif de sPBP3\* est favorable à une interaction avec un substrat plus complexe que le monomère pentapeptidique, il est en fait suffisamment large pour accueillir un substrat réticulé (Figure 18) et donc *a fortiori* un pentapeptide monomérique.



**Figure 18. Positionnement d'un dimère peptidique dans le site actif de sPBP3\*.** L'échelle de couleur symbolisant la valeur du potentiel électrostatique est indiquée. Les zones colorées en rouge sont chargées négativement, celles en bleu sont chargées positivement.

Le dimère peptidique NAG-NAM-L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala



est représenté en mode bonds. Cette figure a été réalisée à l'aide du programme Grasp.

Le site actif de PBP3 serait donc capable d'interagir avec les monomères et les dimères du PG pré-existant et avec les monomères portés par le lipide II ou les chaînes polysaccharidiques précurseurs.

La comparaison des structures tridimensionnelles de la D,D-transpeptidase K15 et des D,D-CPases de type PBP5 va dans le sens de cette hypothèse. En effet, la réaction de transpeptidation catalysée par K15 requiert l'entrée de deux chaînes peptidiques dans le site actif de la protéine. Le haut degré de ressemblance du site actif de la D,D-transpeptidase K15 et de sPBP5' ou de sPBP3\* indique donc que le site actif de ces deux dernières serait capable d'accepter des dimères.

Enfin, un dernier argument est apporté par la publication récente de l'activité de PBP5 d'*E. coli* pour différents analogues de substrats. PBP5 a une plus forte affinité pour des peptides analogues des chaînes peptidiques du PG de *S. pneumoniae* que pour des analogues des chaînes peptidiques du PG d'*E. coli* (Anderson *et al.*, 2003). Les deux types de chaîne

peptidique diffèrent seulement par la présence d'une Lys en troisième position chez *S. pneumoniae* et d'un diaminopimélate chez *E. coli*. Si le site actif des D,D-CPases de type PBP5 est capable d'accueillir des dimères, alors il doit être suffisamment spacieux pour permettre l'entrée de monomères dont la composition diffère légèrement de celle de son substrat naturel, expliquant l'absence de spécificité de PBP5 pour les analogues de son propre substrat monomérique.

### VI.5.2. Accessibilité de PBP3 à ses substrats pentapeptidiques

Si la disposition de PBP3 dans le périplasme est telle que celle proposée pour PBP5 par Nelson *et al.* (Nelson et Young, 2001) et que les chaînes glycanes sont orientées parallèlement à la membrane interne (Figure 19A et E), alors les dimensions de la protéine impliquent que seuls les pentapeptides monomériques des couches inférieures du PG seraient accessibles au site actif de PBP3 (peptides en rouge dans la figure 19A). Dans le cas d'une orientation des chaînes glycanes perpendiculaire à la membrane cytoplasmique (Dmitriev *et al.*, 2003), PBP3 aurait accès aux pentapeptides mono ou multimériques proches des extrémités inférieures (pointant vers la membrane interne) des chaînes glycanes (peptides en rouge dans la figure 19B). La localisation bi-hémisphérique de PBP3 dans les cellules qui ne sont pas encore rentrées en division (voir la publication n°II) permettrait à la D,D-CPase de transformer tous ces pentapeptides en tétrapeptides incapables de servir de peptides donneurs dans la réaction de transpeptidation. Dans cette optique, le domaine C-terminal de PBP3 servirait donc à positionner le domaine catalytique de la protéine au plus près de ses substrats peptidiques.

S'il existe des précurseurs polysaccharidiques du PG (Figure 19D), alors ces derniers doivent se situer très près des couches inférieures du PG au moment de leur incorporation au PG pré-existant. La verticalité serait donc la disposition de PBP3 la plus favorable à une interaction avec ces substrats-ci.

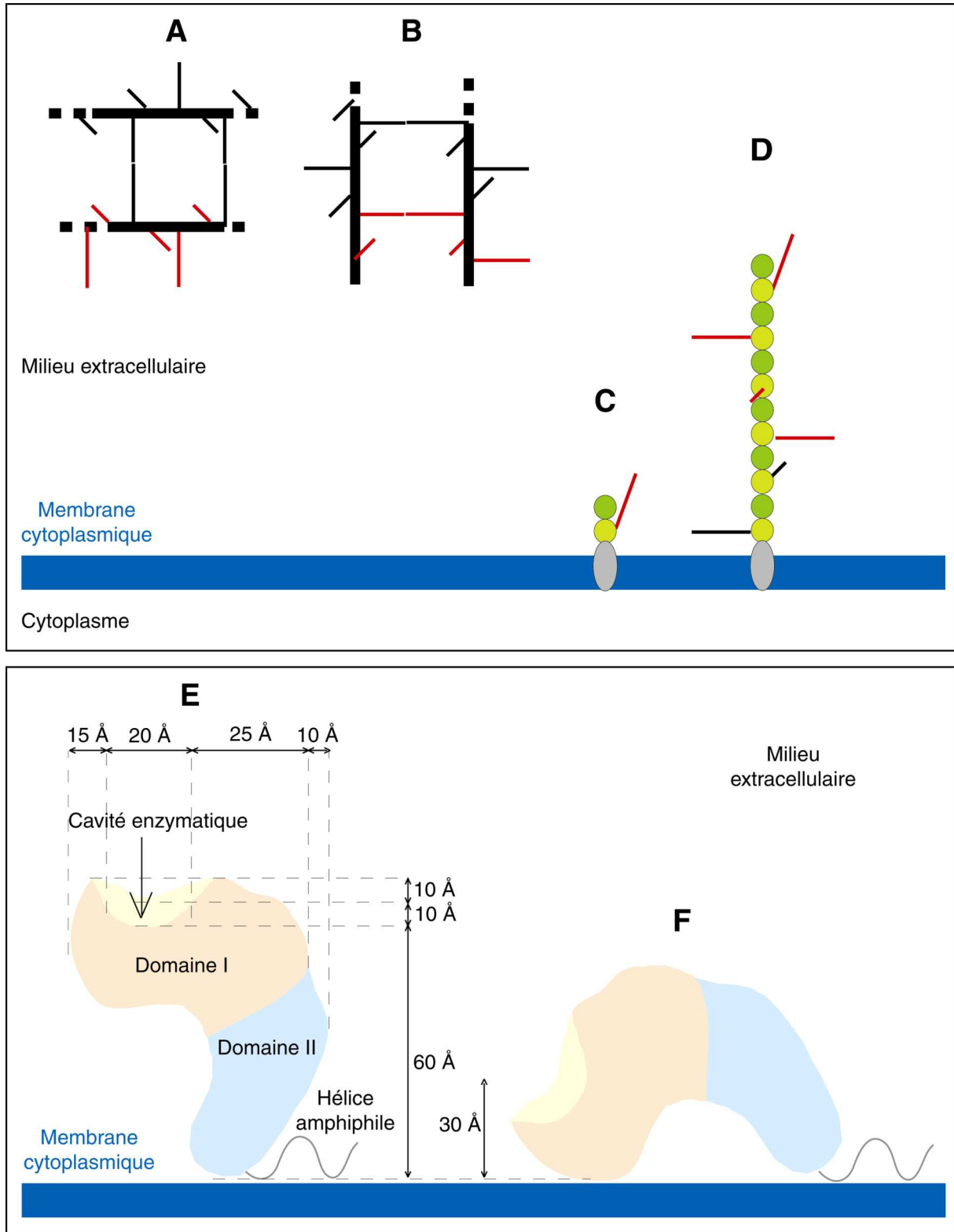
Pour atteindre les peptides portés par le lipide II, PBP3 devrait basculer d'environ 90° (Figure 19F), par rapport à l'orientation proposée précédemment, pour se rapprocher de la membrane interne. Le mécanisme d'association de PBP3 à la membrane cytoplasmique, via l'hélice C-terminale amphiphile, devrait autoriser un tel basculement. Si PBP3 adopte la position décrite dans la figure 19F, l'entrée du site actif se situerait à une trentaine d'Å au-dessus de la membrane interne, distance qui autoriserait difficilement l'entrée de la partie

peptidique du lipide II. En effet, l'extrémité d'un pentapeptide porté par le lipide II ne s'élève pas à plus de 25 Å au-dessus de la membrane cytoplasmique. Pour que PBP3 parvienne à se rapprocher suffisamment de la membrane, il faudrait donc que l'enzyme bascule sur son flan. Cette hypothèse est peu probable car la charge négative portée par la totalité de la surface de PBP3 créerait un phénomène de répulsion avec les têtes polaires, chargées négativement, des lipidiques de la membrane cytoplasmique.

Même si PBP3 est dotée d'une certaine flexibilité, seules les hypothèses d'une interaction de la CPase avec les pentapeptides portés par le PG pré-existant ou des chaînes polysaccharidiques précurseurs semblent donc véritablement plausibles. La position de l'enzyme la mieux adaptée à une interaction avec ces substrats serait celle qui est proposée dans la figure 19E, c'est-à-dire perpendiculairement à la membrane interne.

Au début du cycle cellulaire, PBP3 exercerait donc son activité D,D-CPase sur ces deux substrats potentiels ou sur un seul d'entre eux afin d'empêcher la synthèse de PG ailleurs qu'au futur site de division. L'exclusion de PBP3 du futur site de division permettrait de préserver les pentapeptides dans cette zone équatoriale d'où émergent les trois sites de synthèse du PG.

Au cours de la phase de synthèse du PG, les hypothèses concernant les substrats potentiels de PBP3 et le positionnement de la protéine sont les mêmes, et il semble toujours peu probable que la CPase agisse sur le lipide II. Si le lipide II n'est pas la cible de PBP3, c'est qu'il ne doit probablement pas être incorporé directement au PG pré-existant. Il serait donc pris en charge par les glycosyltransférases pour synthétiser des chaînes polysaccharidiques précurseurs qui sont, quant à elles, accessibles à PBP3. Au niveau du PG pré-existant et/ou des précurseurs polysaccharidiques, PBP3 transformerait les pentapeptides en tétrapeptides, eux-même transformés en tripeptides par une L,D-CPase. Ces tripeptides seraient utilisés comme accepteurs de la réaction de transpeptidation (voir le paragraphe IV.4 dans la présentation bibliographique). Les pentapeptides portés par le lipide II et par les précurseurs polysaccharidiques seraient quant à eux utilisés comme donneurs de la réaction de transpeptidation. En régulant le nombre de pentapeptides et/ou de tripeptides présents dans les zones de néo-synthèse, PBP3 assurerait un contrôle du degré de réticulation du néo-PG.



**Figure 19. Accessibilité de PBP3 à ses substrats peptidiques potentiels.** A : Chaînes glycanes disposées parallèlement à la membrane cytoplasmique, position des couches inférieures de PG. B : Chaînes glycanes disposées perpendiculairement à la membrane cytoplasmique, position des extrémités des chaînes glycanes pointant vers la membrane interne. C : Disposition du lipide II. D : Disposition des chaînes polysaccharidiques précurseurs. Les traits épais symbolisent les chaînes glycanes, les traits fins symbolisent les peptides. Les substrats pentapeptidiques potentiels de PBP3 sont indiqués en rouge. Les cercles vert foncé correspondent au GlcNAc, les cercles vert clair au MurNAc et l'ellipse grise à l'undécaprénol. E-F : Orientation perpendiculaire (E) ou oblique (F) de PBP3 par rapport à la membrane cytoplasmique.





## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**



Malgré les efforts déployés depuis le milieu des années soixante pour élucider les mécanismes de croissance et de division bactériennes, ces deux processus restent encore aujourd'hui relativement mal compris. Dans le but de combler le manque de connaissances relatives à la croissance et la division du pathogène humain *S. pneumoniae*, nous nous sommes intéressés au cours de cette thèse au fonctionnement de ses PBPs, catalyseurs des dernières étapes de la biosynthèse du peptidoglycane. Pour ce faire, nous avons développé une méthode de double marquage par immunofluorescence permettant d'étudier le comportement cellulaire de cette famille de protéines (Publications n°I et II). Ces travaux ayant souligné le rôle central de la D,D-carboxypeptidase PBP3 dans la régulation de la division du pneumocoque, nous avons réalisé l'étude fonctionnelle et structurale de cette PBP de faible masse moléculaire.

Afin de discuter des conséquences biologiques de la localisation des protéines étudiées, nous avons émis l'hypothèse raisonnable que FtsZ et les PBPs exercent leur activité respective de constriction de la membrane et de synthèse du peptidoglycane au niveau de leur site de localisation. Nous avons montré que le pneumocoque possède trois sites de synthèse du PG (publication n°I). Au niveau des deux premiers sites dont la position coïncide avec celles des excroissances équatoriales de peptidoglycane, PBP2b, PBP2a et PBP1b catalysent l'insertion périphérique de néo-peptidoglycane. Au niveau du troisième site, site de division de la bactérie, PBP2x, PBP1a et PBP1b catalysent la synthèse du peptidoglycane septal. Bien qu'une co-localisation cellulaire n'engendre pas forcément des interactions protéiques, ces résultats sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle des complexes multienzymatiques seraient associés à la synthèse du peptidoglycane. D'après nos résultats, un « élongasome », comprenant au minimum PBP2b et PBP2a, se chargerait de la synthèse du peptidoglycane périphérique alors qu'un « septasome », comprenant au minimum PBP2x et PBP1a, se chargerait de la synthèse du peptidoglycane septal. Il semble peu probable que la spécificité de ces complexes hypothétiques repose sur la présence d'une PBP de classe A particulière. En effet, bien que PBP2a et PBP1a soient impliquées spécifiquement dans le processus de croissance pour la première et de division pour la seconde, ces deux PBPs perdent leur rôle spécifique en l'absence de l'une ou de l'autre et sont capables de se remplacer mutuellement. Il semblerait donc que la spécificité du type de néo-peptidoglycane synthétisé par ces complexes potentiels résiderait dans la présence respective de PBP2b ou de PBP2x, donc d'une PBP de classe B particulière. Ces deux PBPs sont d'ailleurs essentielles à la survie du pneumocoque. Chacune de ces PBPs pourrait interagir spécifiquement avec l'une des deux PBPs de classe A dans le contexte de type sauvage. La recherche d'éventuelles interactions

moléculaires par des techniques biochimiques (électrophorèses non dénaturantes, agents réticulants) ou génétiques (système double hybride) au sein de ces deux groupes de PBPs permettrait de vérifier l'existence de ces complexes hypothétiques. Le cas échéant, il faudrait identifier les autres participants à l'élongasome et au septasome (transglycosylases lytiques, endopeptidases, ...) par exemple en tentant de capturer des partenaires par immuno-précipitation ou par chromatographie d'affinité.

Le double marquage des PBPs avec FtsZ a révélé de manière inattendue la non co-localisation de ces protéines durant la majeure partie du cycle cellulaire (Publication n°I). Au niveau du site de division, la constriction des structures annulaires formées par les PBPs est retardée d'environ 5 minutes sur la constriction de l'anneau Z. Si les PBPs forment un disque creux dont le diamètre interne est égal à celui de l'anneau Z, alors seules les PBPs présentes sur la périphérie interne du disque peuvent interagir avec le polymère de FtsZ. Ces PBPs pourraient catalyser un assemblage primaire de peptidoglycane alors que les autres PBPs réparties sur la surface du disque pourraient effectuer une maturation du peptidoglycane en augmentant son degré de réticulation. Le fait que les PBPs de classe A présentent également ce retard de localisation limite toutefois la validité de cette première hypothèse. En effet, il semble peu probable que la maturation du peptidoglycane requiert la présence d'enzymes bi-fonctionnelles, ces dernières sont plus certainement impliquées dans l'assemblage primaire de néo-peptidoglycane. La deuxième hypothèse présentée ci-après semble donc plus vraisemblable. Les PBPs formeraient un anneau dont le diamètre interne serait supérieur à celui de l'anneau Z, et il existerait ainsi un découplage physique entre FtsZ et les PBPs au cours de la division cellulaire.

Cette hypothèse remet en cause l'existence ou du moins la composition du divisome, complexe multienzymatique de division au sein duquel seraient couplées les activités d'invagination de la membrane cytoplasmique et de synthèse du peptidoglycane septal. En effet, nos résultats sont favorables à la présence d'interactions entre l'anneau Z et les PBPs avant le début de la division mais ils montrent que ces interactions ne perdurent pas tout au long du cycle cellulaire. En tenant compte de la co-localisation observée entre FtsW et PBP2x, nous proposons donc l'existence d'un minimum de deux complexes multienzymatiques en charge de la division du pneumocoque. Au premier complexe participeraient les protéines FtsZ, FtsA, FtsK, FtsQ, FtsL et FtsB, alors que le deuxième impliquerait les protéines FtsW, PBP2x (FtsI), PBP1a et PBP1b. Nous proposons que ces deux complexes interagissent au début du cycle cellulaire avant de se scinder en deux complexes indépendants dès que les cellules entrent en division. Pour prouver l'existence de

ces complexes de constriction et de septation, il nous faudra vérifier la co-localisation des protéines Fts autres que FtsW et tenter de démontrer les interactions protéiques qu'ils sous-tendent. En attendant, différentes observations issues de notre laboratoire ou relatées dans la littérature argumentent fortement en faveur de l'hypothèse du double complexe. Par exemple chez *B. subtilis* la constriction de la membrane ne s'arrête pas lorsque la synthèse du peptidoglycane septal est inhibée alors que cette dernière est supposée constituer l'un des moteurs de l'invagination membranaire dans la conception classique du divisome. Ensuite, aucune interaction entre une protéine Fts, hormis FtsW, et une PBP impliquée dans la synthèse du septum n'a encore été rapportée. Nos propos sont également confortés par un constat assez surprenant : à ce jour, seules deux PBPs solubles, provenant de *Streptomyces* K15 et de *Streptomyces* R61, ont montré une activité transpeptidase sur des substrats proches du substrat naturel. Aucune activité transpeptidase n'a en revanche pu être démontrée pour les PBPs d'*E. coli*, de *B. subtilis* ou de *S. pneumoniae* qui sont des protéines membranaires. Il est possible que l'activité transpeptidase des PBPs solubles soit non spécifique et que ces dernières puissent accepter n'importe quel substrat. A l'inverse, la grande spécificité des PBPs membranaires leur permettrait d'accepter uniquement leur substrat naturel, soit le peptidoglycane non ponté. Cependant, nous pouvons également émettre l'hypothèse que les PBPs membranaires aient besoin d'interagir avec d'autres protéines au sein de complexes multienzymatiques pour exercer leur activité.

Chez *E. coli*, le recrutement de PBP3 (FtsI) au site de division dépend de FtsW. Nos travaux révèlent un fonctionnement différent chez le pneumocoque puisqu'en l'absence de la D,D-carboxypeptidase PBP3, PBP2x (FtsI) ne co-localise plus ni avec FtsZ, ni avec FtsW au début du cycle cellulaire (Publication n°II). Chez *S. pneumoniae*, il semblerait en fait que PBP2x ainsi que toutes les autres PBPs de haute masse moléculaire soient recrutées spécifiquement au futur site de division à la condition que ce dernier constitue la seule zone enrichie en pentapeptides donneurs de la réaction de transpeptidation. La partition de la paroi en zones fonctionnelles ou inertes en termes de synthèse du PG est vraisemblablement assurée par la D,D-carboxypeptidase PBP3. La résolution de la structure tri-dimensionnelle d'une forme soluble de PBP3 sauvage nous a permis d'analyser la vraisemblance des hypothèses émises concernant les substrats de la D,D-carboxypeptidase.

Les caractéristiques structurales de la protéine sont favorables à une interaction de PBP3 avec des précurseurs polysaccharidiques proches des couches inférieures de peptidoglycane ou avec les pentapeptides portés par ces dernières. Avant que les cellules n'entrent en division, PBP3 exercerait son activité D,D-carboxypeptidase sur ces deux types

de substrats afin de restreindre la présence de pentapeptides à la zone équatoriale de laquelle naissent les trois sites de synthèse du peptidoglycane. PBP3 permet ainsi de coupler, au début du cycle cellulaire, les machineries de synthèse du peptidoglycane et de constriction de la membrane cytoplasmique. La D,D-carboxypeptidase se concentrerait ensuite vers les zones de néo-synthèse du peptidoglycane afin d'en réguler le degré de réticulation. Il serait maintenant intéressant de déterminer par quel mécanisme PBP3 est d'abord exclue du site de division de la bactérie, puis recrutée vers les zones de néo-synthèse du peptidoglycane. Il est possible qu'au niveau du futur site de division, la composition lipidique de la membrane cytoplasmique diffère de celle du reste de la cellule. L'association de l'hélice C-terminale amphiphile de PBP3 à la membrane serait ainsi déstabilisée par certains lipides membranaires présents exclusivement au futur site de division de la bactérie. Alternativement, PBP3 pourrait être exclue du site de division via un phénomène de répulsion entre son hélice C-terminale amphiphile et une protéine membranaire. L'étude de la localisation cellulaire de peptides composés de l'hélice C-terminale de PBP3 permettrait de déterminer le rôle de cette région amphiphile dans la localisation de la D,D-carboxypeptidase.

Bien que le repliement de PBP3 soit globalement très proche de celui de son homologue PBP5 chez *E. coli*, les deux protéines présentent des différences structurales intéressantes. La comparaison de leur structure tri-dimensionnelle a conduit à l'identification de deux groupes de D,D-carboxypeptidases caractérisés par la taille de la boucle «  $\Omega$ -like », reliant les hélices  $\alpha_6$  et  $\alpha_8$ , et la composition de leur substrat pentapeptidique. Les D,D-CPases du premier groupe, auquel appartient PBP5 d'*E. coli*, possèdent une boucle «  $\Omega$ -like » courte et sont issues de bactéries dont le peptidoglycane possède un diaminopimélate en troisième position de la chaîne peptidique. Les D,D-CPases du premier groupe, auquel appartient PBP3 de *S. pneumoniae*, possèdent une boucle «  $\Omega$ -like » plus longue et sont issues de bactéries chez lesquelles la chaîne peptidique du peptidoglycane porte une lysine en troisième position. La boucle «  $\Omega$ -like » est donc certainement impliquée dans la reconnaissance du substrat pentapeptidique. Nous pourrions tester cette hypothèse en étudiant les conséquences phénotypiques de l'échange de la boucle «  $\Omega$ -like » de PBP3 par celle de PBP5, ou inversement. Il serait également utile de résoudre la structure tridimensionnelle de ces D,D-carboxypeptidases complexées avec un analogue de substrat.

La résolution de la structure de PBP3 ne nous a pas permis de comprendre pourquoi certaines bactéries, *E. coli* par exemple, possèdent plusieurs D,D-carboxypeptidases de type PBP5 alors que d'autres comme *S. pneumoniae* n'en possèdent qu'une. L'étude de la localisation de PBP5 chez *E. coli* aiderait à mieux comprendre cette divergence. Nous

pourrions également tenter de substituer la PBP3 chez *S. pneumoniae* par l'une des quatre D,D-CPases d'*E. coli*, ou inversement. Dans cette même perspective, nous pourrions créer des hybrides dans lesquels différents éléments structuraux de PBP3 et PBP5 seraient interchangeables. L'identification des hybrides capables de compléter l'absence de PBP3 ou de PBP5 chez *S. pneumoniae* ou *E. coli*, respectivement, nous permettrait par ailleurs de mettre en évidence certaines régions structurales essentielles au rôle biologique des D,D-carboxypeptidases de type PBP5.

Le peptidoglycane est un composé spécifiquement bactérien, présent chez quasiment toutes les espèces. Le peptidoglycane constitue donc une cible thérapeutique idéale. L'inhibition de sa voie de bio-synthèse requiert l'inactivation d'une ou plusieurs des activités enzymatiques qui y sont associées. Les activités transpeptidase ou D,D-carboxypeptidase sont déjà la cible des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines, auxquels plusieurs souches bactériennes ont développé des mécanismes de résistance alarmants. Il est donc essentiel de bloquer la synthèse du peptidoglycane par des stratégies différentes, soit de manière directe en inhibant l'activité glycosyltransférase qui reste une cible encore non exploitée, soit de manière indirecte en ciblant des interactions moléculaires indispensables au fonctionnement des PBPs. Chez le pneumocoque, la recherche de partenariats potentiels peut maintenant être guidée par la connaissance des PBPs impliquées spécifiquement dans les processus de synthèse périphérique ou septale du peptidoglycane. En revanche, l'extrapolation de nos résultats à d'autres espèces bactériennes paraît difficile car l'identité de séquence entre deux PBPs de classe A est généralement inférieure à 35 %. Peut-être la résolution de la structure tridimensionnelle de quelques PBPs de classe A nous permettrait-elle d'identifier une signature structurale caractéristique de la participation de la protéine à la croissance ou à la division bactérienne.

Les différences morphologiques qui existent entre un bacille et un coque laissent présager une grande disparité dans leurs mécanismes de croissance et de division cellulaire. Toutefois, nos travaux ont montré que les deux processus de synthèse du peptidoglycane chez les coques ressemblaient fortement à ceux de la septation chez les bacilles. Ces observations suggèrent que les bacilles aient pu évoluer à partir d'un coque. Les bacilles auraient acquis une phase supplémentaire de synthèse du peptidoglycane, la phase d'élongation diffuse, qui permet d'insérer du néo-peptidoglycane sur toute la partie cylindrique de la bactérie. Inversement, les coques auraient pu évoluer à partir d'un bacille. Les coques auraient alors



perdu la phase d'élongation diffuse et n'auraient conservé que les deux processus de synthèse périphérique et septale du peptidoglycane.

Nos résultats, qui révèlent une similitude surprenante dans la croissance et la division des ces deux types bactériens très différents, ouvrent également certaines perspectives thérapeutiques. En effet, l'approfondissement des recherches concernant les mécanismes de synthèse du peptidoglycane communs aux coques et aux bacilles pourrait mener à l'identification de partenariats protéiques conservés. Les molécules qui parviendraient à inhiber ces interactions protéiques auraient un pouvoir antibactérien à large spectre.

## **BIBLIOGRAPHIE**



- Adachi, H., Ohta, T. and Matsuzawa, H. (1991) Site-directed mutants, at position 166, of RTEM-1 beta-lactamase that form a stable acyl-enzyme intermediate with penicillin. *J Biol Chem*, **266**, 3186-91.
- Adam, M., Fraipont, C., Rhazi, N., Nguyen-Disteche, M., Lakaye, B., Frere, J.M., Devreese, B., Van Beeumen, J., van Heijenoort, Y., van Heijenoort, J. and Ghuysen, J.M. (1997) The bimodular G57-V577 polypeptide chain of the class B penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* catalyzes peptide bond formation from thioesters and does not catalyze glycan chain polymerization from the lipid II intermediate. *J Bacteriol*, **179**, 6005-9.
- Addinall, S.G., Bi, E. and Lutkenhaus, J. (1996) FtsZ ring formation in fts mutants. *J Bacteriol*, **178**, 3877-84.
- Addinall, S.G. and Holland, B. (2002) The tubulin ancestor, FtsZ, draughtsman, designer and driving force for bacterial cytokinesis. *J Mol Biol*, **318**, 219-36.
- Addinall, S.G. and Lutkenhaus, J. (1996a) FtsA is localized to the septum in an FtsZ-dependent manner. *J Bacteriol*, **178**, 7167-72.
- Addinall, S.G. and Lutkenhaus, J. (1996b) FtsZ-spirals and -arcs determine the shape of the invaginating septa in some mutants of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **22**, 231-7.
- Aldea, M., Garrido, T., Pla, J. and Vicente, M. (1990) Division genes in *Escherichia coli* are expressed coordinately to cell septum requirements by gearbox promoters. *Embo J*, **9**, 3787-94.
- Amanuma, H. and Strominger, J.L. (1980) Purification and properties of penicillin-binding proteins 5 and 6 from *Escherichia coli* membranes. *J Biol Chem*, **255**, 11173-80.
- Amanuma, H. and Strominger, J.L. (1984) Purification and properties of penicillin-binding proteins 5 and 6 from the dacA mutant strain of *Escherichia coli* (JE 11191). *J Biol Chem*, **259**, 1294-8.
- Anderson, J.W., Adedirán, S.A., Charlier, P., Nguyen-Disteche, M., Frere, J.M., Nicholas, R.A. and Pratt, R.F. (2003) On the substrate specificity of bacterial DD-peptidases: evidence from two series of peptidoglycan-mimetic peptides. *Biochem J*, **373**, 949-55.
- Aussel, L., Barre, F.X., Aroyo, M., Stasiak, A., Stasiak, A.Z. and Sherratt, D. (2002) FtsK Is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell*, **108**, 195-205.
- Ayala, J.A., Garrido, T., de Pedro, M.A. and Vicente, M. (1994) Molecular biology of bacterial septation. In *Bacterial Cell Wall (Edited by J. M. Ghuysen and R. Hakenbeck)*. Elsevier Science B. V. Amsterdam, 73-102.
- Barbour, A.G., Amano, K., Hackstadt, T., Perry, L. and Caldwell, H.D. (1982) *Chlamydia trachomatis* has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid. *J Bacteriol*, **151**, 420-8.
- Beall, B. and Lutkenhaus, J. (1989) Nucleotide sequence and insertional inactivation of a *Bacillus subtilis* gene that affects cell division, sporulation, and temperature sensitivity. *J Bacteriol*, **171**, 6821-34.
- Beck, B.D. and Park, J.T. (1976) Activity of three murein hydrolases during the cell division cycle of *Escherichia coli* K-12 as measured in toluene-treated cells. *J Bacteriol*, **126**, 1250-60.
- Begg, K.J., Dewar, S.J. and Donachie, W.D. (1995) A new *Escherichia coli* cell division gene, ftsK. *J Bacteriol*, **177**, 6211-22.
- Begg, K.J. and Donachie, W.D. (1985) Cell shape and division in *Escherichia coli*: experiments with shape and division mutants. *J Bacteriol*, **163**, 615-22.
- Begg, K.J., Takasuga, A., Edwards, D.H., Dewar, S.J., Spratt, B.G., Adachi, H., Ohta, T., Matsuzawa, H. and Donachie, W.D. (1990) The balance between different peptidoglycan precursors determines whether *Escherichia coli* cells will elongate or divide. *J Bacteriol*, **172**, 6697-703.
- Beveridge, T.J. (1981) Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. *Int Rev Cytol*, **72**, 229-317.

- Bi, E.F. and Lutkenhaus, J. (1991) FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature*, **354**, 161-4.
- Boger, D.L. (2001) Vancomycin, teicoplanin, and ramoplanin: synthetic and mechanistic studies. *Med Res Rev*, **21**, 356-81.
- Boneca, I.G. and Chiosis, G. (2003) Vancomycin resistance: occurrence, mechanisms and strategies to combat it. *Expert Opin Ther Targets*, **7**, 311-28.
- Bork, P., Sander, C. and Valencia, A. (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7290-4.
- Botta, G.A. and Park, J.T. (1981) Evidence for involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation but not during cell elongation. *J Bacteriol*, **145**, 333-40.
- Boyle, D.S., Khattar, M.M., Addinall, S.G., Lutkenhaus, J. and Donachie, W.D. (1997) ftsW is an essential cell-division gene in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **24**, 1263-73.
- Bramhill, D. (1997) Bacterial cell division. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 395-424.
- Bramhill, D. and Thompson, C.M. (1994) GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5813-7.
- Briles, E.B. and Tomasz, A. (1970) Radioautographic evidence for equatorial wall growth in a gram-positive bacterium. Segregation of choline-3H-labeled teichoic acid. *J Cell Biol*, **47**, 786-90.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54**, 905-21.
- Buddelmeijer, N. and Beckwith, J. (2002) Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. *Curr Opin Microbiol*, **5**, 553-7.
- Buddelmeijer, N., Judson, N., Boyd, D., Mekalanos, J.J. and Beckwith, J. (2002) YgbQ, a cell division protein in *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*, localizes in codependent fashion with FtsL to the division site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6316-21.
- Carson, M.J., Barondess, J. and Beckwith, J. (1991) The FtsQ protein of *Escherichia coli*: membrane topology, abundance, and cell division phenotypes due to overproduction and insertion mutations. *J Bacteriol*, **173**, 2187-95.
- C.C.P.N. (1994) *Acta Cryst.*, **D50**, 760-763.
- Chalut, C., Remy, M.H. and Masson, J.M. (1999) Disulfide bridges are not involved in penicillin-binding protein 1b dimerization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **181**, 2970-2.
- Charpentier, X., Chalut, C., Remy, M.H. and Masson, J.M. (2002) Penicillin-binding proteins 1a and 1b form independent dimers in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **184**, 3749-52.
- Chen, J.C., Weiss, D.S., Ghigo, J.M. and Beckwith, J. (1999) Septal localization of FtsQ, an essential cell division protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **181**, 521-30.
- Chesnel, L., Pernot, L., Lemaire, D., Champelovier, D., Croize, J., Dideberg, O., Vernet, T. and Zapun, A. (2003) The structural modifications induced by the M339F substitution in PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*, further decreases the susceptibility to beta -lactams of resistant strains. *J Biol Chem*, **15**, 15.
- Chesnel, L., Zapun, A., Mouz, N., Dideberg, O. and Vernet, T. (2002) Increase of the deacylation rate of PBP2x from *Streptococcus pneumoniae* by single point mutations mimicking the class A beta-lactamases. *Eur J Biochem*, **269**, 1678-83.

- Coffey, T.J., Dowson, C.G., Daniels, M. and Spratt, B.G. (1993) Horizontal spread of an altered penicillin-binding protein 2B gene between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis*. *FEMS Microbiol Lett*, **110**, 335-9.
- Cole, R.M. and Hahn, J.J. (1962) Cell Wall Replication in *Streptococcus pyogenes*. *Science*, **135**, 722-724.
- Cooper, S. (1991a) Bacterial growth and division. Academic Press, Inc., San Diego, Calif. .
- Cooper, S. (1991b) Synthesis of the cell surface during the division cycle of rod-shaped, gram-negative bacteria. *Microbiol Rev*, **55**, 649-74.
- Corbin, B.D., Yu, X.C. and Margolin, W. (2002) Exploring intracellular space: function of the Min system in round-shaped *Escherichia coli*. *Embo J*, **21**, 1998-2008.
- Dai, K. and Lutkenhaus, J. (1991) *ftsZ* is an essential cell division gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **173**, 3500-6.
- Dai, K. and Lutkenhaus, J. (1992) The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **174**, 6145-51.
- Dai, K., Xu, Y. and Lutkenhaus, J. (1993) Cloning and characterization of *ftsN*, an essential cell division gene in *Escherichia coli* isolated as a multicopy suppressor of *ftsA12(Ts)*. *J Bacteriol*, **175**, 3790-7.
- Dai, K., Xu, Y. and Lutkenhaus, J. (1996) Topological characterization of the essential *Escherichia coli* cell division protein FtsN. *J Bacteriol*, **178**, 1328-34.
- Daniel, R.A. and Errington, J. (2000) Intrinsic instability of the essential cell division protein FtsL of *Bacillus subtilis* and a role for DivIB protein in FtsL turnover. *Mol Microbiol*, **36**, 278-89.
- Daniel, R.A., Harry, E.J. and Errington, J. (2000) Role of penicillin-binding protein PBP 2B in assembly and functioning of the division machinery of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **35**, 299-311.
- Daniel, R.A., Harry, E.J., Katis, V.L., Wake, R.G. and Errington, J. (1998) Characterization of the essential cell division gene *ftsL*(yIID) of *Bacillus subtilis* and its role in the assembly of the division apparatus. *Mol Microbiol*, **29**, 593-604.
- Daniel, R.A., Williams, A.M. and Errington, J. (1996) A complex four-gene operon containing essential cell division gene *pbpB* in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **178**, 2343-50.
- Darmon, P. (1999) *L'homme et les microbes.*, 7.
- Datta, P., Dasgupta, A., Bhakta, S. and Basu, J. (2002) Interaction between FtsZ and FtsW of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, **277**, 24983-7.
- Davies, C., White, S.W. and Nicholas, R.A. (2001) Crystal structure of a deacylation-defective mutant of penicillin-binding protein 5 at 2.3-Å resolution. *J Biol Chem*, **276**, 616-23.
- de Boer, P., Crossley, R. and Rothfield, L. (1992a) The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature*, **359**, 254-6.
- de Boer, P.A., Crossley, R.E., Hand, A.R. and Rothfield, L.I. (1991) The MinD protein is a membrane ATPase required for the correct placement of the *Escherichia coli* division site. *Embo J*, **10**, 4371-80.
- de Boer, P.A., Crossley, R.E. and Rothfield, L.I. (1992b) Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **174**, 63-70.
- de Jonge, B.L., Wientjes, F.B., Jurida, I., Driehuis, F., Wouters, J.T. and Nanninga, N. (1989) Peptidoglycan synthesis during the cell cycle of *Escherichia coli*: composition and mode of insertion. *J Bacteriol*, **171**, 5783-94.

- de La Fortelle, E. and Bricogne, G. (1997) Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymol.*, **276**, 472-494.
- de Pedro, M.A., Donachie, W.D., Holtje, J.V. and Schwarz, H. (2001) Constitutive septal murein synthesis in *Escherichia coli* with impaired activity of the morphogenetic proteins RodA and penicillin-binding protein 2. *J Bacteriol*, **183**, 4115-26.
- de Pedro, M.A., Quintela, J.C., Holtje, J.V. and Schwarz, H. (1997) Murein segregation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **179**, 2823-34.
- de Pedro, M.A. and Schwarz, U. (1981) Heterogeneity of newly inserted and preexisting murein in the sacculus of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 5856-60.
- Demchick, P. and Koch, A.L. (1996) The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **178**, 768-73.
- Den Blaauwen, T., Aarsman, M.E., Vischer, N.O. 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**, 539-47.
- Denome, S.A., Elf, P.K., Henderson, T.A., Nelson, D.E. and Young, K.D. (1999) *Escherichia coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis. *J Bacteriol*, **181**, 3981-93.
- Dessen, A., Di Guilmi, A.M., Vernet, T. and Dideberg, O. (2001a) Molecular mechanisms of antibiotic resistance in gram-positive pathogens. *Curr Drug Targets Infect Disord*, **1**, 63-77.
- Dessen, A., Mouz, N., Gordon, E., Hopkins, J. and Dideberg, O. (2001b) Crystal structure of PBP2x from a highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate: a mosaic framework containing 83 mutations. *J Biol Chem*, **276**, 45106-12.
- Dewar, S.J., Begg, K.J. and Donachie, W.D. (1992) Inhibition of cell division initiation by an imbalance in the ratio of FtsA to FtsZ. *J Bacteriol*, **174**, 6314-6.
- Di Guilmi, A.M., Dessen, A., Dideberg, O. and Vernet, T. (2002) Bifunctional penicillin-binding proteins: focus on the glycosyltransferase domain and its specific inhibitor moenomycin. *Curr Pharm Biotechnol*, **3**, 63-75.
- Di Guilmi, A.M., Dessen, A., Dideberg, O. and Vernet, T. (2003a) Functional Characterization of Penicillin-Binding Protein 1b from *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, **185**, 1650-8.
- Di Guilmi, A.M., Dessen, A., Dideberg, O. and Vernet, T. (2003b) The Glycosyltransferase Domain of Penicillin-Binding Protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* Catalyzes the Polymerization of Murein Glycan Chains. *J Bacteriol*, **185**, 4418-23.
- Di Guilmi, A.M., Mouz, N., Andrieu, J.P., Hoskins, J., Jaskunas, S.R., Gagnon, J., Dideberg, O. and Vernet, T. (1998) Identification, purification, and characterization of transpeptidase and glycosyltransferase domains of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 1a. *J Bacteriol*, **180**, 5652-9.
- Di Guilmi, A.M., Mouz, N., Martin, L., Hoskins, J., Jaskunas, S.R., Dideberg, O. and Vernet, T. (1999) Glycosyltransferase domain of penicillin-binding protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* is membrane associated. *J Bacteriol*, **181**, 2773-81.
- Diaz, N., Suarez, D., Sordo, T.L. and Merz, K.M. (2001) Acylation of class A  $\beta$ -lactamases by penicillins: A theoretical examination of the role of Serine 130 and the  $\beta$ -lactam carboxylate group. *J. Phys. Chem. B*, **105**, 11302-11313.
- Dideberg, O., Charlier, P., Wery, J.P., Dehottay, P., Dusart, J., Erpicum, T., Frere, J.M. and Ghuysen, J.M. (1987) The crystal structure of the beta-lactamase of *Streptomyces albus* G at 0.3 nm resolution. *Biochem J*, **245**, 911-3.

- Dijkstra, A.J. and Keck, W. (1996) Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *J Bacteriol*, **178**, 5555-62.
- Din, N., Quardokus, E.M., Sackett, M.J. and Brun, Y.V. (1998) Dominant C-terminal deletions of FtsZ that affect its ability to localize in *Caulobacter* and its interaction with FtsA. *Mol Microbiol*, **27**, 1051-63.
- Dmitriev, B.A., Ehlers, S. and Rietschel, E.T. (1999) Layered murein revisited: a fundamentally new concept of bacterial cell wall structure, biogenesis and function. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, **187**, 173-81.
- Dmitriev, B.A., Ehlers, S., Rietschel, E.T. and Brennan, P.J. (2000) Molecular mechanics of the mycobacterial cell wall: from horizontal layers to vertical scaffolds. *Int J Med Microbiol*, **290**, 251-8.
- Dmitriev, B.A., Toukach, F.V., Schaper, K.J., Holst, O., Rietschel, E.T. and Ehlers, S. (2003) Tertiary structure of bacterial murein: the scaffold model. *J Bacteriol*, **185**, 3458-68.
- Dowson, C.G., Coffey, T.J., Kell, C. and Whiley, R.A. (1993) Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*; the role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2B in *S. pneumoniae*. *Mol Microbiol*, **9**, 635-43.
- Dowson, C.G., Hutchison, A., Brannigan, J.A., George, R.C., Hansman, D., Linares, J., Tomasz, A., Smith, J.M. and Spratt, B.G. (1989a) Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 8842-6.
- Dowson, C.G., Hutchison, A. and Spratt, B.G. (1989b) Extensive re-modelling of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2B of a penicillin-resistant South African isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, **3**, 95-102.
- Dowson, C.G., Hutchison, A., Woodford, N., Johnson, A.P., George, R.C. and Spratt, B.G. (1990) Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5858-62.
- Edwards, D.H. and Errington, J. (1997) The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Mol Microbiol*, **24**, 905-15.
- 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**, 519-23.
- Errington, J., Daniel, R.A. and Scheffers, D.J. (2003) Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**, 52-65.
- Filipe, S.R., Pinho, M.G. and Tomasz, A. (2000) Characterization of the murMN operon involved in the synthesis of branched peptidoglycan peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*, **275**, 27768-74.
- 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**, 4891-6.
- Fonze, E., Vermeire, M., Nguyen-Disteche, M., Bresseur, R. and Charlier, P. (1999) The crystal structure of a penicilloyl-serine transferase of intermediate penicillin sensitivity. The DD-transpeptidase of streptomyces K15. *J Biol Chem*, **274**, 21853-60.
- Frere, J.M., Ghuysen, J.M. and Iwatsubo, M. (1975) Kinetics of interaction between the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R61 and beta-lactam antibiotics. A choice of models. *Eur J Biochem*, **57**, 343-51.
- Fu, X., Shih, Y.L., Zhang, Y. and Rothfield, L.I. (2001) The MinE ring required for proper placement of the division site is a mobile structure that changes its cellular location during the *Escherichia coli* division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 980-5.



- Fuad, N., Frere, J.M., Ghuysen, J.M., Duez, C. and Iwatsubo, M. (1976) Mode of interaction between beta-lactam antibiotics and the exocellular DD-carboxypeptidase--transpeptidase from *Streptomyces* R39. *Biochem J*, **155**, 623-9.
- Garcia-Bustos, J. and Tomasz, A. (1990) A biological price of antibiotic resistance: major changes in the peptidoglycan structure of penicillin-resistant pneumococci. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5415-9.
- Garcia-Bustos, J.F., Chait, B.T. and Tomasz, A. (1987) Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. *J Biol Chem*, **262**, 15400-5.
- Gerard, P., Vernet, T. and Zapun, A. (2002) Membrane topology of the *Streptococcus pneumoniae* FtsW division protein. *J Bacteriol*, **184**, 1925-31.
- Ghigo, J.M. and Beckwith, J. (2000) Cell division in *Escherichia coli*: role of FtsL domains in septal localization, function, and oligomerization. *J Bacteriol*, **182**, 116-29.
- Ghigo, J.M., Weiss, D.S., Chen, J.C., Yarrow, J.C. and Beckwith, J. (1999) Localization of FtsL to the *Escherichia coli* septal ring. *Mol Microbiol*, **31**, 725-37.
- Ghosh, A.S. and Young, K.D. (2003) Sequences near the active site in chimeric penicillin binding proteins 5 and 6 affect uniform morphology of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **185**, 2178-86.
- Ghuysen, J.M. (1991) Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol*, **45**, 37-67.
- Ghuysen, J.M. (1994) Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends Microbiol*, **2**, 372-80.
- Ghuysen, J.M. and Goffin, C. (1999) Lack of cell wall peptidoglycan versus penicillin sensitivity: new insights into the chlamydial anomaly. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**, 2339-44.
- Girard, E., Chantalat, L., Vicat, J. and Kahn, R. (2002) Gd-HPDO3A, a complex to obtain high-phasing-power heavy-atom derivatives for SAD and MAD experiments: results with tetragonal hen egg-white lysozyme. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**, 1-9.
- Girard, E., Stelter, M., Anelli, P.L., Vicat, J. and Kahn, R. (2003) A new class of gadolinium complexes employed to obtain high-phasing-power heavy-atom derivatives: results from SAD experiments with hen egg-white lysozyme and urate oxidase from *Aspergillus flavus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **59**, 118-26.
- Giudicelli, S. and Tomasz, A. (1984) Attachment of pneumococcal autolysin to wall teichoic acids, an essential step in enzymatic wall degradation. *J Bacteriol*, **158**, 1188-90.
- Glauner, B. and Holtje, J.V. (1990) Growth pattern of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **265**, 18988-96.
- Glauner, B., Holtje, J.V. and Schwarz, U. (1988) The composition of the murein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **263**, 10088-95.
- Goffin, C., Fraipont, C., Ayala, J., Terrak, M., Nguyen-Disteche, M. and Ghuysen, J.M. (1996) The non-penicillin-binding module of the tripartite penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* is required for folding and/or stability of the penicillin-binding module and the membrane-anchoring module confers cell septation activity on the folded structure. *J Bacteriol*, **178**, 5402-9.
- Goffin, C. and Ghuysen, J.M. (1998) Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 1079-93.
- Goldman, R.C. and Gange, D. (2000) Inhibition of transglycosylation involved in bacterial peptidoglycan synthesis. *Curr Med Chem*, **7**, 801-20.
- Goodell, E.W. (1985) Recycling of murein by *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **163**, 305-10.

- Gordon, E., Mouz, N., Duee, E. and Dideberg, O. (2000) The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J Mol Biol*, **299**, 477-85.
- Gordon, E., Mouz, N., Vernet, T. and Dideberg, O. (1999) Structural insights into antibiotic-target interactions. Ed Harwood Academic Publishers. .
- Guillaume, G., Vanhove, M., Lamotte-Brasseur, J., Ledent, P., Jamin, M., Joris, B. and Frere, J.M. (1997) Site-directed mutagenesis of glutamate 166 in two beta-lactamases. Kinetic and molecular modeling studies. *J Biol Chem*, **272**, 5438-44.
- Guzman, L.M., Barondess, J.J. and Beckwith, J. (1992) FtsL, an essential cytoplasmic membrane protein involved in cell division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **174**, 7716-28.
- Hakenbeck, R., Ellerbrok, H., Briese, T., Handwerger, S. and Tomasz, A. (1986) Penicillin-binding proteins of penicillin-susceptible and -resistant pneumococci: immunological relatedness of altered proteins and changes in peptides carrying the beta-lactam binding site. *Antimicrob Agents Chemother*, **30**, 553-8.
- Hakenbeck, R. and Kohiyama, M. (1982) Purification of penicillin-binding protein 3 from *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Biochem*, **127**, 231-6.
- Hakenbeck, R., Konig, A., Kern, I., van der Linden, M., Keck, W., Billot-Klein, D., Legrand, R., Schoot, B. and Gutmann, L. (1998) Acquisition of five high-Mr penicillin-binding protein variants during transfer of high-level beta-lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, **180**, 1831-40.
- Hakenbeck, R., Tarpay, M. and Tomasz, A. (1980) Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, **17**, 364-71.
- Hale, C.A. and de Boer, P.A. (1997) Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. *Cell*, **88**, 175-85.
- Hale, C.A., Meinhardt, H. and de Boer, P.A. (2001) Dynamic localization cycle of the cell division regulator MinE in *Escherichia coli*. *Embo J*, **20**, 1563-72.
- Hara, H., Yasuda, S., Horiuchi, K. and Park, J.T. (1997) A promoter for the first nine genes of the *Escherichia coli* mra cluster of cell division and cell envelope biosynthesis genes, including *ftsI* and *ftsW*. *J Bacteriol*, **179**, 5802-11.
- Harry, E.J. (2001) Bacterial cell division: regulating Z-ring formation. *Mol Microbiol*, **40**, 795-803.
- Harz, H., Burgdorf, K. and Holtje, J.V. (1990) Isolation and separation of the glycan strands from murein of *Escherichia coli* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, **190**, 120-8.
- Havarstein, L.S., Hakenbeck, R. and Gaustad, P. (1997) Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change phenotype by interspecies recombinational exchanges. *J Bacteriol*, **179**, 6589-94.
- Helfand, M.S. and Bonomo, R.A. (2003) Beta-lactamases: a survey of protein diversity. *Curr Drug Targets Infect Disord*, **3**, 9-23.
- Higgins, M.L., Pooley, H.M. and Shockman, G.D. (1971) Reinitiation of cell wall growth after threonine starvation of *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol*, **105**, 1175-83.
- Higgins, M.L. and Shockman, G.D. (1970) Model for cell wall growth of *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol*, **101**, 643-8.
- 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**, 1346-58.

- Holtje, J.V. (1993) "Three for one" - a simple growth mechanism that guarantees a precise copy of the thin, rod-shaped murein sacculus of *Escherichia coli*. In *Bacterial growth and lysis : Metabolism and structure of the bacterial sacculus*. de Pedro, M.A., Holtje, J.V., Löffelhardt, W. (ed.) New York & London: *Plenum Press.* , **419-426**.
- Holtje, J.V. (1996a) A hypothetical holoenzyme involved in the replication of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology*, **142**, 1911-8.
- Holtje, J.V. (1996b) Molecular interplay of murein synthases and murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist*, **2**, 99-103.
- Holtje, J.V. (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 181-203.
- Holtje, J.V. and Tomasz, A. (1975) Specific recognition of choline residues in the cell wall teichoic acid by the N-acetylmuramyl-L-alanine amidase of *Pneumococcus*. *J Biol Chem*, **250**, 6072-6.
- Hu, Z. and Lutkenhaus, J. (2000) Analysis of MinC reveals two independent domains involved in interaction with MinD and FtsZ. *J Bacteriol*, **182**, 3965-71.
- Hu, Z., Mukherjee, A., Pichoff, S. and Lutkenhaus, J. (1999) The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14819-24.
- Huber, G. and Neesemann, G. (1968) Moenomycin, an inhibitor of cell wall synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, **30**, 7-13.
- Ikeda, M., Sato, T., Wachi, M., Jung, H.K., Ishino, F., Kobayashi, Y. and Matsushashi, M. (1989) Structural similarity among *Escherichia coli* FtsW and RodA proteins and *Bacillus subtilis* SpoVE protein, which function in cell division, cell elongation, and spore formation, respectively. *J Bacteriol*, **171**, 6375-8.
- Ishino, F., Jung, H.K., Ikeda, M., Doi, M., Wachi, M. and Matsushashi, M. (1989) New mutations *fts-36*, *fts-33*, and *ftsW* clustered in the *mra* region of the *Escherichia coli* chromosome induce thermosensitive cell growth and division. *J Bacteriol*, **171**, 5523-30.
- Ishino, F. and Matsushashi, M. (1981) Peptidoglycan synthetic enzyme activities of highly purified penicillin-binding protein 3 in *Escherichia coli*: a septum-forming reaction sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, **101**, 905-11.
- Ishino, F., Mitsui, K., Tamaki, S. and Matsushashi, M. (1980) Dual enzyme activities of cell wall peptidoglycan synthesis, peptidoglycan transglycosylase and penicillin-sensitive transpeptidase, in purified preparations of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1A. *Biochem Biophys Res Commun*, **97**, 287-93.
- Ishino, F., Park, W., Tomioka, S., Tamaki, S., Takase, I., Kunugita, K., Matsuzawa, H., Asoh, S., Ohta, T., Spratt, B.G. and et al. (1986) Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and rodA protein. *J Biol Chem*, **261**, 7024-31.
- Izaki, K., Matsushashi, M. and Strominger, J.L. (1966) Glycopeptide transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **55**, 656-63.
- Izaki, K., Matsushashi, M. and Strominger, J.L. (1968) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. 8. Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reaction in strains of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **243**, 3180-92.
- Jackson, M.E. and Pratt, J.M. (1987) An 18 amino acid amphiphilic helix forms the membrane-anchoring domain of the *Escherichia coli* penicillin-binding protein 5. *Mol Microbiol*, **1**, 23-8.
- Jamin, M., Damblon, C., Millier, S., Hakenbeck, R. and Frere, J.M. (1993) Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: enzymic activities and interactions with beta-lactams. *Biochem J*, **292**, 735-41.

- Jelsch, C., Mourey, L., Masson, J.M. and Samama, J.P. (1993) Crystal structure of Escherichia coli TEM1 beta-lactamase at 1.8 Å resolution. *Proteins*, **16**, 364-83.
- Jones, L.J., Carballido-Lopez, R. and Errington, J. (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in Bacillus subtilis. *Cell*, **104**, 913-22.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. and Kjeldgaard. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A*, **47**, 110-9.
- Joris, B., Ghuysen, J.M., Dive, G., Renard, A., Dideberg, O., Charlier, P., Frere, J.M., Kelly, J.A., Boyington, J.C., Moews, P.C. and et al. (1988) The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the Streptomyces R61 DD-peptidase family. *Biochem J*, **250**, 313-24.
- Kato, J., Suzuki, H. and Hirota, Y. (1985) Dispensability of either penicillin-binding protein-1a or -1b involved in the essential process for cell elongation in Escherichia coli. *Mol Gen Genet*, **200**, 272-7.
- Kell, C.M., Sharma, U.K., Dowson, C.G., Town, C., Balganes, 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**, 171-5.
- Kelly, J.A., Knox, J.R., Moews, P.C., Hite, G.J., Bartolone, J.B., Zhao, H., Joris, B., Frere, J.M. and Ghuysen, J.M. (1985) 2.8-Å Structure of penicillin-sensitive D-alanyl carboxypeptidase-transpeptidase from Streptomyces R61 and complexes with beta-lactams. *J Biol Chem*, **260**, 6449-58.
- Kelly, J.A., Knox, J.R., Zhao, H., Frere, J.M. and Ghaysen, J.M. (1989) Crystallographic mapping of beta-lactams bound to a D-alanyl-D-alanine peptidase target enzyme. *J Mol Biol*, **209**, 281-95.
- Kelly, J.A. and Kuzin, A.P. (1995) The refined crystallographic structure of a DD-peptidase penicillin-target enzyme at 1.6 Å resolution. *J Mol Biol*, **254**, 223-36.
- Koch, A.L. (1988) Biophysics of bacterial walls viewed as stress-bearing fabric. *Microbiol Rev*, **52**, 337-53.
- Koch, A.L. (1998) Orientation of the peptidoglycan chains in the sacculus of Escherichia coli. *Res Microbiol*, **149**, 689-701.
- Koch, A.L. (2000) Simulation of the conformation of the murein fabric: the oligoglycan, penta-muropeptide, and cross-linked nona-muropeptide. *Arch Microbiol*, **174**, 429-39.
- Labischinski, H., Barnickel, G., Naumann, D. and Keller, P. (1985) Conformational and topological aspects of the three-dimensional architecture of bacterial peptidoglycan. *Ann Inst Pasteur Microbiol*, **136A**, 45-50.
- Labischinski, H., Goodell, E.W., Goodell, A. and Hochberg, M.L. (1991) Direct proof of a "more-than-single-layered" peptidoglycan architecture of Escherichia coli W7: a neutron small-angle scattering study. *J Bacteriol*, **173**, 751-6.
- Labischinski, H. and Maidhof, H. (1994) Bacterial peptidoglycan : overview and evolving concepts. In *Bacterial cell wall*. Ghuysen, J.M and Hakenbeck, R. (ed.). Elsevier, Amsterdam. , 23-39.
- Laible, G., Spratt, B.G. and Hakenbeck, R. (1991) Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of Streptococcus pneumoniae. *Mol Microbiol*, **5**, 1993-2002.
- Laitinen, H. and Tomasz, A. (1990) Changes in composition of peptidoglycan during maturation of the cell wall in pneumococci. *J Bacteriol*, **172**, 5961-7.
- Leduc, M., Frehel, C. and van Heijenoort, J. (1985) Correlation between degradation and ultrastructure of peptidoglycan during autolysis of Escherichia coli. *J Bacteriol*, **161**, 627-35.
- Lenfant, F., Labia, R. and Masson, J.M. (1991) Replacement of lysine 234 affects transition state stabilization in the active site of beta-lactamase TEM1. *J Biol Chem*, **266**, 17187-94.

- Leslie, A.G.M. (2002) MOSFLM user guide, Mosflm version 6.2.2 MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, United Kingdom. .
- Levin, P.A. and Losick, R. (1994) Characterization of a cell division gene from *Bacillus subtilis* that is required for vegetative and sporulation septum formation. *J Bacteriol*, **176**, 1451-9.
- Lewis, E.R., Winterberg, K.M. and Fink, A.L. (1997) A point mutation leads to altered product specificity in beta-lactamase catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 443-7.
- Lim, D. and Strynadka, N.C. (2002) Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol*, **9**, 870-6.
- Liu, G., Draper, G.C. and Donachie, W.D. (1998) FtsK is a bifunctional protein involved in cell division and chromosome localization in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **29**, 893-903.
- Lu, C., Stricker, J. and Erickson, H.P. (1998) FtsZ from *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, and *Thermotoga maritima*--quantitation, GTP hydrolysis, and assembly. *Cell Motil Cytoskeleton*, **40**, 71-86.
- Ma, X. and Margolin, W. (1999) Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ. *J Bacteriol*, **181**, 7531-44.
- Malhotra, K.T. and Nicholas, R.A. (1992) Substitution of lysine 213 with arginine in penicillin-binding protein 5 of *Escherichia coli* abolishes D-alanine carboxypeptidase activity without affecting penicillin binding. *J Biol Chem*, **267**, 11386-91.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) Molecular cloning. *A laboratory manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. .
- Margolin, W. (2000a) Organelle division: Self-assembling GTPase caught in the middle. *Curr Biol*, **10**, R328-30.
- Margolin, W. (2000b) Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol Rev*, **24**, 531-48.
- Margolin, W. (2001) Spatial regulation of cytokinesis in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 647-52.
- Marston, A.L., Thomaides, H.B., Edwards, D.H., Sharpe, M.E. and Errington, J. (1998) Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes Dev*, **12**, 3419-30.
- Martin, C., Briese, T. and Hakenbeck, R. (1992a) Nucleotide sequences of genes encoding penicillin-binding proteins from *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* with high homology to *Escherichia coli* penicillin-binding proteins 1a and 1b. *J Bacteriol*, **174**, 4517-23.
- Martin, C., Sibold, C. and Hakenbeck, R. (1992b) Relatedness of penicillin-binding protein 1a genes from different clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in South Africa and Spain. *Embo J*, **11**, 3831-6.
- Massidda, O., Anderluzzi, D., Friedli, L. and Feger, G. (1998) Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, **144**, 3069-78.
- Matsushashi, M., Tamaki, S., Curtis, S.J. and Strominger, J.L. (1979) Mutational evidence for identity of penicillin-binding protein 5 in *Escherichia coli* with the major D-alanine carboxypeptidase IA activity. *J Bacteriol*, **137**, 644-7.
- Matsushashi, M., Wachi, M. and Ishino, F. (1990) Machinery for cell growth and division: penicillin-binding proteins and other proteins. *Res Microbiol*, **141**, 89-103.
- Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, **33**, 491-7.

- McPherson, A., Malkin, A.J. and Kuznetsov, Y.G. (1995) The science of macromolecular crystallization. *Structure*, **3**, 759-68.
- McPherson, D.C. and Popham, D.L. (2003) Peptidoglycan Synthesis in the Absence of Class A Penicillin-Binding Proteins in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **185**, 1423-31.
- Mercer, K.L. and Weiss, D.S. (2002) The *Escherichia coli* cell division protein FtsW is required to recruit its cognate transpeptidase, FtsI (PBP3), to the division site. *J Bacteriol*, **184**, 904-12.
- Merchante, R., Pooley, H.M. and Karamata, D. (1995) A periplasm in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **177**, 6176-83.
- Mirelman, D., Yashouv-Gan, Y., Nuchamovitz, Y., Rozenhak, S. and Ron, E.Z. (1978) Murein biosynthesis during a synchronous cell cycle of *Escherichia coli* B. *J Bacteriol*, **134**, 458-61.
- Mirelman, D., Yashouv-Gan, Y. and Schwarz, U. (1977) Regulation of murein biosynthesis and septum formation in filamentous cells of *Escherichia coli* PAT 84. *J Bacteriol*, **129**, 1593-600.
- Mosser, J.L. and Tomasz, A. (1970) Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J Biol Chem*, **245**, 287-98.
- Mouz, N., Di Guilmi, A.M., Gordon, E., Hakenbeck, R., Dideberg, O. and Vernet, T. (1999) Mutations in the active site of penicillin-binding protein PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*. Role in the specificity for beta-lactam antibiotics. *J Biol Chem*, **274**, 19175-80.
- Mouz, N., Gordon, E., Di Guilmi, A.M., Petit, I., Petillot, Y., Dupont, Y., Hakenbeck, R., Vernet, T. and Dideberg, O. (1998) Identification of a structural determinant for resistance to beta-lactam antibiotics in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13403-6.
- Mukherjee, A. and Lutkenhaus, J. (1994) Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J Bacteriol*, **176**, 2754-8.
- Murray, T., Popham, D.L. and Setlow, P. (1998) *Bacillus subtilis* cells lacking penicillin-binding protein 1 require increased levels of divalent cations for growth. *J Bacteriol*, **180**, 4555-63.
- Nakagawa, J., Tamaki, S. and Matsushashi, M. (1979) *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1379-1380.
- Nakagawa, J., Tamaki, S., Tomioka, S. and Matsushashi, M. (1984) Functional biosynthesis of cell wall peptidoglycan by polymorphic bifunctional polypeptides. Penicillin-binding protein 1Bs of *Escherichia coli* with activities of transglycosylase and transpeptidase. *J Biol Chem*, **259**, 13937-46.
- Nanninga, N. (1991) Cell division and peptidoglycan assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **5**, 791-5.
- Nelson, D.E., Ghosh, A.S., Paulson, A.L. and Young, K.D. (2002) Contribution of membrane-binding and enzymatic domains of penicillin binding protein 5 to maintenance of uniform cellular morphology of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **184**, 3630-9.
- Nelson, D.E. and Young, K.D. (2000) Penicillin binding protein 5 affects cell diameter, contour, and morphology of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **182**, 1714-21.
- Nelson, D.E. and Young, K.D. (2001) Contributions of PBP 5 and DD-carboxypeptidase penicillin binding proteins to maintenance of cell shape in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **183**, 3055-64.
- Nguyen-Disteche, M., Fraipont, C., Buddelmeijer, N. and Nanninga, N. (1998) The structure and function of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 3. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 309-16.
- Nicholas, R.A. and Strominger, J.L. (1988) Site-directed mutants of a soluble form of penicillin-binding protein 5 from *Escherichia coli* and their catalytic properties. *J Biol Chem*, **263**, 2034-40.

- Nicola, G., Nicholas, R.A. and Davies, C. Crystal Structure of Wild-Type Penicillin-Binding Protein 5 at 2.0 Å Resolution. Manuscrit en préparation. .
- Ohashi, T., Hale, C.A., de Boer, P.A. and Erickson, H.P. (2002) Structural evidence that the P/Q domain of ZipA is an unstructured, flexible tether between the membrane and the C-terminal FtsZ-binding domain. *J Bacteriol*, **184**, 4313-5.
- Oliva, M., Dideberg, O. and Field, M.J. (2003) Understanding the acylation mechanisms of active-site serine penicillin-recognizing proteins: a molecular dynamics simulation study. *Proteins*, **53**, 88-100.
- Pagliero, E., Chesnel, L., Hopkins, J., Croizé, J., Dideberg, O., Vernet, T. and Di Guilmi, A.M. (2003) Biochemical characterization of *Streptococcus pneumoniae* Penicillin-Binding Protein 2b and its implication in résistance to bêta-lactams. *J Bacteriol*, Sous presse.
- 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**, 3852-6.
- Pares, S., Mouz, N., Petillot, Y., Hakenbeck, R. and Dideberg, O. (1996) X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme [see comments]. *Nat Struct Biol*, **3**, 284-9.
- Pedersen, L.B., Angert, E.R. and Setlow, P. (1999) Septal localization of penicillin-binding protein 1 in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **181**, 3201-11.
- Perkins, H.R. (1969) Specificity of combination between mucopeptide precursors and vancomycin or ristocetin. *Biochem J*, **111**, 195-205.
- Phoenix, D.A. (1990) Investigation into structural features of the *Escherichia coli* penicillin-binding protein 5 C-terminal anchor. *Biochem Soc Trans*, **18**, 948-9.
- Pichoff, S. and Lutkenhaus, J. (2002) Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *Embo J*, **21**, 685-93.
- Pisabarro, A.G., Prats, R., Vaquez, D. and Rodriguez-Tebar, A. (1986) Activity of penicillin-binding protein 3 from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **168**, 199-206.
- Pogliano, J., Pogliano, K., Weiss, D.S., Losick, R. and Beckwith, J. (1997) Inactivation of FtsI inhibits constriction of the FtsZ cytokinetic ring and delays the assembly of FtsZ rings at potential division sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 559-64.
- Pratt, J.M., Jackson, M.E. and Holland, I.B. (1986) The C terminus of penicillin-binding protein 5 is essential for localisation to the *E. coli* inner membrane. *Embo J*, **5**, 2399-405.
- RayChaudhuri, D. (1999) ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division. *Embo J*, **18**, 2372-83.
- Robson, S.A., Michie, K.A., Mackay, J.P., Harry, E. and King, G.F. (2002) The *Bacillus subtilis* cell division proteins FtsL and DivIC are intrinsically unstable and do not interact with one another in the absence of other septosomal components. *Mol Microbiol*, **44**, 663-74.
- Romeis, T. and Holtje, J.V. (1994) Specific interaction of penicillin-binding proteins 3 and 7/8 with soluble lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **269**, 21603-7.
- Ropp, P.A. and Nicholas, R.A. (1997) Cloning and characterization of the ponA gene encoding penicillin-binding protein 1 from *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol*, **179**, 2783-7.
- Rowland, S.L., Katis, V.L., Partridge, S.R. and Wake, R.G. (1997) DivIB, FtsZ and cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **23**, 295-302.
- Sanchez, M., Valencia, A., Ferrandiz, M.J., Sander, C. and Vicente, M. (1994) Correlation between the structure and biochemical activities of FtsA, an essential cell division protein of the actin family. *Embo J*, **13**, 4919-25.

- Saves, I. and Masson, J.M. (1998) Mechanisms of resistance to xenobiotics in human therapy. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 405-26.
- Scherrer, R. and Gerhardt, P. (1971) Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. *J Bacteriol*, **107**, 718-35.
- Schiffer, G. and Holtje, J.V. (1999) Cloning and characterization of PBP 1C, a third member of the multimodular class A penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **274**, 32031-9.
- 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**, 6499-505.
- Schwartz, B., Markwalder, J.A. and Wang, Y. (2001) Lipid II: total synthesis of the bacterial cell wall precursor and utilization as a substrate for glycosyltransfer and transpeptidation by penicillin binding protein (PBP) 1b of *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc*, **123**, 11638-43.
- Severin, A., Schuster, C., Hakenbeck, R. and Tomasz, A. (1992) Altered murein composition in a DD-carboxypeptidase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 5152-5155.
- Severin, A., Severina, E. and Tomasz, A. (1997) Abnormal physiological properties and altered cell wall composition in *Streptococcus pneumoniae* grown in the presence of clavulanic acid. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**, 504-10.
- Severin, A. and Tomasz, A. (1996) Naturally occurring peptidoglycan variants of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, **178**, 168-74.
- Sheldrick, G.M. (1997) SHELXL97. Program for the refinement of Crystal Structure. University of Göttingen, Germany. .
- Sheldrick, G.M. (1998) Direct methods for solving macromolecular structures. Edited by S. Fortie, Dordrecht:Luwer Academic Publishers, 401-411.
- Shih, Y.L., Le, T. and Rothfield, L. (2003) Division site selection in *Escherichia coli* involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 7865-70.
- Sibold, C., Henrichsen, J., König, A., Martin, C., Chalkley, L. and Hakenbeck, R. (1994) Mosaic pbpX genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from pbpX genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. *Mol Microbiol*, **12**, 1013-23.
- Sievers, J. and Errington, J. (2000a) Analysis of the essential cell division gene ftsL of *Bacillus subtilis* by mutagenesis and heterologous complementation. *J Bacteriol*, **182**, 5572-9.
- Sievers, J. and Errington, J. (2000b) The *Bacillus subtilis* cell division protein FtsL localizes to sites of septation and interacts with DivIC. *Mol Microbiol*, **36**, 846-55.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150**, 76-85.
- Spratt, B.G. (1975) Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 2999-3003.
- Spratt, B.G. (1977) Temperature-sensitive cell division mutants of *Escherichia coli* with thermolabile penicillin-binding proteins. *J Bacteriol*, **131**, 293-305.
- Spratt, B.G. (1980) Deletion of the penicillin-binding protein 5 gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **144**, 1190-2.



- Spratt, B.G. (1994) Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*, **264**, 388-93.
- Spratt, B.G. and Cromie, K.D. (1988) Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. *Rev Infect Dis*, **10**, 699-711.
- Spratt, B.G. and Pardee, A.B. (1975) Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. *Nature*, **254**, 516-7.
- Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E.V. and Davis, R.W. (1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science*, **282**, 754-9.
- 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**, 3171-5.
- Strynadka, N.C., Adachi, H., Jensen, S.E., Johns, K., Sielecki, A., Betzel, C., Sutoh, K. and James, M.N. (1992) Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in beta-lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution [see comments]. *Nature*, **359**, 700-5.
- Sun, Q. and Margolin, W. (2001) Influence of the nucleoid on placement of FtsZ and MinE rings in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **183**, 1413-22.
- Sun, Q., Yu, X.C. and Margolin, W. (1998) Assembly of the FtsZ ring at the central division site in the absence of the chromosome. *Mol Microbiol*, **29**, 491-503.
- Suzuki, H., Nishimura, Y. and Hirota, Y. (1978) On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a series of mutants of *E. coli* altered in the penicillin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 664-8.
- Suzuki, H., van Heijenoort, Y., Tamura, T., Mizoguchi, J., Hirota, Y. and van Heijenoort, J. (1980) In vitro peptidoglycan polymerization catalysed by penicillin binding protein 1b of *Escherichia coli* K-12. *FEBS Lett*, **110**, 245-9.
- Tamura, T., Imae, Y. and Strominger, J.L. (1976) Purification to homogeneity and properties of two D-alanine carboxypeptidases I From *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **251**, 414-23.
- Thibessard, A., Fernandez, A., Gintz, B., Leblond-Bourget, N. and Decaris, B. (2002) Effects of rodA and pbp2b disruption on cell morphology and oxidative stress response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *J Bacteriol*, **184**, 2821-6.
- Tipper, D.J. and Strominger, J.L. (1965) Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **54**, 1133-41.
- Tomasz, A. (1967) Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. *Science*, **157**, 694-7.
- Tomasz, A. (1968) Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of *Pneumococcus*: chanin formation, loss of transformability, and loss of autolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **59**, 86-93.
- Tomasz, A. (1979a) From penicillin-binding proteins to the lysis and death of bacteria: a 1979 view. *Rev Infect Dis*, **1**, 434-67.
- Tomasz, A. (1979b) The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **33**, 113-37.
- Tomasz, A. (2000) *Streptococcus pneumoniae*: functional anatomy in *Streptococcus pneumoniae*: molecular biology & mechanisms of disease, (A. Tomasz, editor), New York, Mary Ann Liebert, Inc. , 9-21.
- Tomasz, A., Jamieson, J.D. and Ottolenghi, E. (1964) The fine structure of *Diplococcus pneumoniae*. *J. Cell Biol.*, **22**, 453-467.

- Tomasz, A., McDonnell, M., Westphal, M. and Zanati, E. (1975a) Coordinated incorporation of nascent peptidoglycan and teichoic acid into pneumococcal cell walls and conservation of peptidoglycan during growth. *J Biol Chem*, **250**, 337-41.
- Tomasz, A., Westphal, M., Briles, E.B. and Fletcher, P. (1975b) On the physiological functions of teichoic acids. *J Supramol Struct*, **3**, 1-16.
- Tomasz, A., Zanati, E. and Ziegler, R. (1971) DNA uptake during genetic transformation and the growing zone of the cell envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 1848-52.
- van den Ent, F., Amos, L.A. and Lowe, J. (2001) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature*, **413**, 39-44.
- van den Ent, F. and Lowe, J. (2000) Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *Embo J*, **19**, 5300-7.
- van Heijenoort, J. (2001a) Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology*, **11**, 25R-36R.
- van Heijenoort, J. (2001b) Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat Prod Rep*, **18**, 503-19.
- van Heijenoort, Y., Leduc, M., Singer, H. and van Heijenoort, J. (1987) Effects of moenomycin on *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, **133**, 667-74.
- van Kley, H. and Hale, S.M. (1977) Assay for protein by dye binding. *Anal Biochem*, **81**, 485-7.
- Verwer, R.W., Beachey, E.H., Keck, W., Stoub, A.M. and Poldermans, J.E. (1980) Oriented fragmentation of *Escherichia coli* sacculi by sonication. *J Bacteriol*, **141**, 327-32.
- Verwer, R.W., Nanninga, N., Keck, W. and Schwarz, U. (1978) Arrangement of glycan chains in the sacculus of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **136**, 723-9.
- Vicente, M. and Errington, J. (1996) Structure, function and controls in microbial division. *Mol Microbiol*, **20**, 1-7.
- Vicente, M. and Lowe, J. (2003) Ring, helix, sphere and cylinder: the basic geometry of prokaryotic cell division. *EMBO Rep*, **4**, 655-60.
- Vollmer, W., von Rechenberg, M. and Holtje, J.V. (1999) Demonstration of molecular interactions between the murein polymerase PBP1B, the lytic transglycosylase MltA, and the scaffolding protein MipA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **274**, 6726-34.
- von Rechenberg, M., Ursinus, A. and Holtje, J.V. (1996) Affinity chromatography as a means to study multienzyme complexes involved in murein synthesis. *Microb Drug Resist*, **2**, 155-7.
- Walker, R.T. (1983) Mycoplasma evolution: a review of the use of ribosomal and transfer RNA nucleotide sequences in the determination of phylogenetic relationships. *Yale J Biol Med*, **56**, 367-72.
- Walsh, C. (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, **406**, 775-81.
- Wang, L., Khattar, M.K., Donachie, W.D. and Lutkenhaus, J. (1998) FtsI and FtsW are localized to the septum in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **180**, 2810-6.
- Weiss, D.S., Chen, J.C., Ghigo, J.M., Boyd, D. and Beckwith, J. (1999) Localization of FtsI (PBP3) to the septal ring requires its membrane anchor, the Z ring, FtsA, FtsQ, and FtsL. *J Bacteriol*, **181**, 508-20.

- Weiss, D.S., Pogliano, K., Carson, M., Guzman, L.M., Fraipont, C., Nguyen-Disteche, M., Losick, R. and Beckwith, J. (1997) Localization of the Escherichia coli cell division protein FtsI (PBP3) to the division site and cell pole. *Mol Microbiol*, **25**, 671-81.
- Wientjes, F.B. and Nanninga, N. (1989) Rate and topography of peptidoglycan synthesis during cell division in Escherichia coli: concept of a leading edge. *J Bacteriol*, **171**, 3412-9.
- Williamson, R., Hakenbeck, R. and Tomasz, A. (1980) In vivo interaction of beta-lactam antibiotics with the penicillin-binding proteins of Streptococcus pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother*, **18**, 629-37.
- Wolfe, S., Kim, C.K. and Yang, K. (1994) Ab initio molecular orbital calculations on neutral hydrolysis and methanolysis of azetidinones, including catalysis by water. Relationship to the mechanism of action of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Can. J. Chem.*, **72**, 1033-1043.
- Yan, K., Pearce, K.H. and Payne, D.J. (2000) A conserved residue at the extreme C-terminus of FtsZ is critical for the FtsA-FtsZ interaction in Staphylococcus aureus. *Biochem Biophys Res Commun*, **270**, 387-92.
- Yanouri, A., Daniel, R.A., Errington, J. and Buchanan, C.E. (1993) Cloning and sequencing of the cell division gene pbpB, which encodes penicillin-binding protein 2B in Bacillus subtilis. *J Bacteriol*, **175**, 7604-16.
- Yao, X., Jericho, M., Pink, D. and Beveridge, T. (1999) Thickness and elasticity of gram-negative murein sacculi measured by atomic force microscopy. *J Bacteriol*, **181**, 6865-75.
- Yousif, S.Y., Broome-Smith, J.K. and Spratt, B.G. (1985) Lysis of Escherichia coli by beta-lactam antibiotics: deletion analysis of the role of penicillin-binding proteins 1A and 1B. *J Gen Microbiol*, **131**, 2839-45.
- Zhao, G., Yeh, W.K., Carnahan, R.H., Flokowitsch, J., Meier, T.I., Alborn, W.E., Jr., Becker, G.W. and Jaskunas, S.R. (1997) Biochemical characterization of penicillin-resistant and -sensitive penicillin-binding protein 2x transpeptidase activities of Streptococcus pneumoniae and mechanistic implications in bacterial resistance to beta-lactam antibiotics. *J Bacteriol*, **179**, 4901-8.
- Zigelboim, S. and Tomasz, A. (1980) Penicillin-binding proteins of multiply antibiotic-resistant South African strains of Streptococcus pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother*, **17**, 434-42.
- Zijderveld, C.A., Aarsman, M.E., den Blaauwen, T. and Nanninga, N. (1991) Penicillin-binding protein 1B of Escherichia coli exists in dimeric forms. *J Bacteriol*, **173**, 5740-6.
- Zijderveld, C.A., Aarsman, M.E. and Nanninga, N. (1995) Differences between inner membrane and peptidoglycan-associated PBP1B dimers of Escherichia coli. *J Bacteriol*, **177**, 1860-3.

## **ANNEXES**



## ANNEXE A

Classification des différentes PBPs chez *S. pneumoniae*, *E. coli* et *B. subtilis*. Sont indiquées entre parenthèses l'implication de certaines PBPs dans les processus de synthèse du peptidoglycane, ainsi que les travaux qui y font référence.

		<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
<b>PBPs de haute masse moléculaire</b>	<b>PBPs de classe A</b>  glycosyltransférases + transpeptidases	PBP1a (septation, ce manuscript)  PBP2a (élongation, ce manuscript)  PBP1b (septation + élongation, ce manuscript)	PBP1a (septation, [Charpentier, 2002 #298])  PBP1b (élongation, [Charpentier, 2002 #298])  PBP1c	PBP1 (septation, [Pedersen, 1999 #277])  PBP2c  PBP4  PBP2d
	<b>PBPs de classe B</b>  transpeptidases	PBP2x (septation, ce manuscript)  PBP2b (élongation, ce manuscript)	PBP3 (septation, [Wang, 1998 #173])  PBP2 (élongation + septation, [Den Blaauwen, 2003 #267])	PBP2a (élongation, [Murray, 1997 #362])  PBP2b (septation, [Daniel, 2000 #279])  PBP3
<b>PBPs de faible masse moléculaire</b>	D,D-carboxypeptidases ou endopeptidases	PBP3 (D,D-carboxypeptidase, [Hakenbeck, 1982 #78])	PBP5 (D,D-carboxypeptidase, [Amanuma, 1980 #83])  PBP6 PBP6b PBP4 PBP7 PBP8	PBP5  PBP5* PBP4a DacE DacF PBPX



## **ANNEXE B : publication**





# Expression and purification of FtsW and RodA from *Streptococcus pneumoniae*, two membrane proteins involved in cell division and cell growth, respectively

Marjolaine Noirclerc-Savoie, Cécile Morlot, Philippe Gérard,<sup>1</sup>  
Thierry Vernet,\* and André Zapun

Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules, Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel (CEA/CNRS/UJF), 41 rue Jules Horowitz,  
38027 Grenoble Cedex 1, France

Received 4 November 2002, and in revised form 20 January 2003

## Abstract

FtsW and RodA are homologous integral membrane proteins involved in bacterial cell division and cell growth, respectively. Both proteins from *Streptococcus pneumoniae* were overexpressed in *Escherichia coli* as N-terminal His-tagged fusions. Their membrane addressing in *E. coli* was demonstrated by cell fractionation and was confirmed for FtsW by immunolocalization. Recombinant FtsW and RodA were solubilized from membranes using 3-(laurylamido)-*N,N'*-dimethylaminopropylamine oxide (LAPAO). The detergent was exchanged to polyoxyethylene 8 lauryl ether (C12E8) during one-step purification procedure by Co<sup>2+</sup>-affinity chromatography. This procedure yielded 50–150 µg protein per litre of culture. Both proteins are likely to be folded as they are resistant to trypsin digestion and could be incorporated into reconstituted lipid vesicles.

© 2003 Published by Elsevier Science (USA).

FtsW and RodA, which were first identified in *Escherichia coli*, as well as SpoVE in *Bacillus subtilis*, [1,2] constitute a family of polytopic membrane proteins termed SEDS<sup>2</sup> for shape, elongation, division, and sporulation [3]. SEDS are present in all bacteria that have a peptidoglycan cell wall [1–3]. Each SEDS appears to be functionally associated with a single class B penicillin-binding protein (PBP) [4]. Class B PBPs are transpeptidases involved in cell-wall synthesis by cross-

linking glycan strands through their peptide linkers [5,6]. One such pair is RodA and PBP2 in *E. coli*, which are both required for cell elongation and shape determination [7–9]. RodA and PBP2 are encoded in the same operon and inactivation of either gene results in *E. coli* spherical cells [8,10]. Although the precise function of RodA remains to be identified, it is required for the functionality of PBP2 [11]. By analogy with RodA and PBP2, it has been suggested that FtsW may act in concert with PBP3 in cell division [1]. The genes encoding FtsW and PBP3 (FtsI) are cotranscribed and their inactivation blocks cell division without affecting cell elongation [12]. Interestingly, in all bacteria whose genome has been fully sequenced, an equivalent number of SEDS and class B PBPs are found. Most genomes encode two such pairs [13], but sometimes three as in *B. subtilis* or even four as in *Streptomyces coelicolor*. These two species have more than one type of cell division, including sporulation. *Streptococcus pyogenes* apparently contains only one SEDS and one class B PBP. FtsW is required for cell division and was shown to be localized at the septum in *E. coli* [14]. In *E. coli*, FtsW is

\* Corresponding author. Fax: +33-4-38-78-54-94.

E-mail address: [vernet@ibs.fr](mailto:vernet@ibs.fr) (T. Vernet).

<sup>1</sup> Present address: UR910, INRA Domaine de Vilvert, Jouy-en-Josas Cedex 78352, France.

<sup>2</sup> Abbreviations used: LAPAO, 3-(laurylamido)-*N,N'*-dimethylaminopropylamine oxide; C12E8, polyoxyethylene 8 lauryl ether; C12M, dodecyl maltoside; C8E5, octyl pentaoxyethylene; Triton X-100, octylphenolpoly(ethyleneglycoether)<sub>n</sub>; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulphonate; CHAPSO, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulphonate; LDAO, dodecyl dimethylamine *N*-oxide; DOPC, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; SEDS, shape, elongation, division, and sporulation proteins; PBP, penicillin-binding protein; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

required to recruit PBP3 (FtsI) to the division site [15]. It has also been suggested that FtsW may play a role in stabilizing the Z-rings during cell division [16], but this finding is debated [15], although a physical interaction between the C-terminal tails of FtsW and FtsZ from *Mycobacterium tuberculosis* has been demonstrated [17]. It was also proposed that FtsW and RodA might be responsible for the translocation of *N*-acetylglucosamine-*N*-acetylmuramoyl-(pentapeptide)-pyrophosphoryl undecaprenol (lipid II), the precursor of peptidoglycan assembly [18]. The lipid II is synthesized in the cytoplasm and translocated across the membrane by an unknown mechanism. On the extra-cytoplasmic side of the membrane, the disaccharides are polymerized by the glycosyl transferase activity of class A PBPs, whereas the pentapeptide linkers are cross-linked by the transpeptidase activity of either class A or class B PBPs [6].

*Streptococcus pneumoniae* is responsible for several human diseases such as pneumonia, meningitis, and ear infections. Nowadays, strains of *S. pneumoniae* are found that resist all classes of antibiotics but glycopeptides. The search for molecules to combat these bacteria is a renewed priority. As FtsW is essential and has no human homologue, it is a potential target for novel antibiotics. The functional characterization and the identification in vitro of molecules interacting with FtsW and/or RodA require pure proteins.

The genes encoding both FtsW and RodA were identified in the genome of *S. pneumoniae* by homology searches and identified as FtsW and RodA, respectively, by scoring their level of identity with well-established SEDS from other organisms [19]. For example, FtsW from *S. pneumoniae* has 27 and 21% identity with FtsW and RodA from *E. coli*, whereas RodA from *S. pneumoniae* has 21 and 26% identity with RodA from *E. coli* [19].

We recently described the membrane topology of FtsW from *S. pneumoniae* which consists of 10 transmembrane segments, a large extracytoplasmic loop between segments 7 and 8, and both N- and C-termini located in the cytoplasm [19]. In the present study, we report the overexpression and localization in *E. coli*, and the purification of the His-tagged membrane proteins FtsW and RodA from *S. pneumoniae*. As a prerequisite to the investigation of the function of SEDS, both purified proteins were incorporated into reconstituted lipid vesicles.

## Materials and methods

### Bacterial strains and plasmids

*Streptococcus pneumoniae* strain R6 was used as a source of chromosomal DNA for PCR amplification of

the *ftsW* and *rodA* genes. *E. coli* strain MC1061 [F<sup>-</sup> *araD139*Δ(*ara-leu*)7696*galE15 galK16* Δ*lacX74 rpsL* (Str<sup>r</sup>) *hsdR2* (r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>) *mcrA mcrB1*] was used as host strain for plasmid construction. The sequences of *S. pneumoniae* *ftsW* and *rodA* were amplified with the primers 5'-ACCATGGGGCA CCATCACCATCACC ATAAGA TTAGTAAGAGGCAC-3' and 5'-GAGA TCTACTTCAACAGAAGGTTTCATTGGTTG-3' for *ftsW*, and 5'-CCATGGGACACCATCACCATCACC ATAAACGTTCTCTCGAC-3' and 5'-AGATCTTATT TAATTTGTTTTAATACAACCTTTTTC-3' for *rodA*. The PCR products were first cloned into pCR-Script (Stratagene) and subcloned as a *NcoI*-*Bgl*II fragment into the arabinose inducible plasmid pARA14 [20]. The resulting constructs pARAW and pARARodA contain codons for a glycine and six histidines introduced after the first Met codon. Both inserts were sequenced.

### Protein expression

Several *E. coli* strains were tested for protein overproduction, DH5α[F<sup>-</sup> φ80*dlacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *deoR recA1 endA1hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>) *phoA supE44* λ<sup>-</sup> *thi-1 gyrA96 relA1*], B834 [F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal dem met*], MC1061 [F<sup>-</sup> *araD139* Δ (*ara leu*)7696*galE15 galK 16* Δ*lacX74 rpsL*(Str<sup>r</sup>) *hsdR2* (r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>) *mcrA mcrB1*], and BL21 C+ (DE3) RP [*E. coli* B F<sup>-</sup> *ompT hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)*dcm*<sup>+</sup>Tet<sup>r</sup> *galλ*(DE3) *endA Hte* [*argU proL Cam*<sup>r</sup>]] (Stratagene).

About 100 ng pARAW or pARARodA was transformed into the *E. coli* expression host strains. Transformants were isolated on LB agar plates supplemented with ampicillin (100 μg/ml) and chloramphenicol (34 μg/ml) for BL21 C+ (DE3) RP strain or ampicillin only for the other strains. A single transformed colony was inoculated into 500 ml Luria broth containing the appropriate antibiotic and grown overnight at 37 °C. Cultures were inoculated with 1:100 dilution of overnight precultures. Cells were grown at 37 °C (FtsW) or 25 °C (RodA) to an optical density at 600 nm of 0.3, prior to induction with 0.005% (w/v) L-arabinose and further incubation for 6 and 3 h for FtsW and RodA, respectively.

### Protein purification

All steps were performed at 0–4 °C. Cells were collected (6000g, 15 min), washed once, and resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM NaCl, supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Complete EDTA free, Roche). Membranes were prepared by sonication of 40 ml cell suspension with a Vibra-Cell 72408 sonicator fitted with a large probe (Bioblock Scientific; pulse on: 2 s; pulse off: 9.9 s; and total pulse time: 2 min) in the presence of 5 mM EDTA, 20 μg/ml ribonuclease A, 20 μg/ml deoxyribonuclease I, and 15 mM MgSO<sub>4</sub>, and supplemented with 15 mM EDTA after sonication.

After the removal of cell debris by centrifugation (12,000g, 15 min), membranes were pelleted (500,000g, 20 min) and washed three times in the same buffered solution. Membranes were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Membranes were resuspended and washed once in 100th of the initial culture volume (to a total protein concentration of about 5 mg/ml) of 20 mM Tris-HCl (pH 8), 600 mM NaCl, and glycerol 10%, Complete EDTA free. Pellets were finally resuspended in the same volume (FtsW) or 1/2 volume (RodA) of 50 mM Hepes (pH 7), glycerol 10%, prior to solubilization by addition of LAPAO to 1% (final concentration). After 10 min on ice, samples were centrifuged (500,000g, 20 min). The supernatants containing solubilized proteins were supplemented with NaCl to 500 mM and incubated for 20 min with 1.25 ml of drained  $\text{Co}^{2+}$ -loaded Talon (Clontech) resin. The detergent exchange was carried out while the proteins were bound to the resin. After extensive washing with 50 mM Hepes (pH 7), 10% glycerol, 300 mM NaCl, 0.05% C12E8, and 10 mM imidazole, His-tagged proteins were eluted with the same buffer containing 250 mM imidazole.

#### *Electrophoretic analysis, tryptic digestion, and protein concentration determination*

Samples were subjected to SDS-PAGE without prior heating in SDS-buffer due to partial or complete precipitation after incubation at 37 or 100  $^{\circ}\text{C}$ , respectively. Migration was performed at 4  $^{\circ}\text{C}$  (150 V) on a discontinuous gel system with 4% (w/v) stacking gel and 12.5% (w/v) resolving gel. After transfer onto nitrocellulose membrane, His-tagged proteins were immunostained with a mouse anti-polyhistidine antibody peroxidase conjugate (Sigma). FtsW and RodA proteins were visualized using the ECL chemiluminescence detection following manufacturer's recommendations (Amersham Pharmacia). Tryptic digestion of FtsW, RodA, and vPBP2x was performed with porcine pancreatic trypsin (crystallized, Sigma) in the  $\text{Co}^{2+}$ -affinity chromatography elution buffer. Protein contamination was monitored on silver-stained gels. Protein concentration was determined with the MicroBCA Assay kit (Uptima) using bovine serum albumin as standard.

#### *Immunofluorescence*

Immunofluorescence staining was adapted from a method described previously [21]. Cultures of BL21 C+ (DE3) RP pARAW in exponential growth, induced or not with 0.005% arabinose, were fixed for 15 min at room temperature and 45 min on ice in 2.5% (v/v) paraformaldehyde and 30 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5). The fixed cells were washed three times in PBS and then resuspended in 90  $\mu\text{l}$  of a solution containing 50 mM glucose, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 10 mM

EDTA. Lysozyme was added to a final concentration of 0.1 mg/ml and cells were immediately transferred to a microscope slide (Sigma) pretreated with poly-L-lysine (0.1%, w/v). After 2 min, each slide was washed twice with PBS and air-dried. Slides were dipped in methanol for 5 min and then in acetone for 30 s at  $-20^{\circ}\text{C}$  and allowed to dry completely. After rehydration with PBS, slides were blocked for 1 h at room temperature with 2% bovine serum albumin in PBS.

The blocking solution was replaced by a 1:50 dilution in bovine serum albumin-PBS of mouse monoclonal anti-His-tag antibodies (Sigma) for 1 h incubation at room temperature. The slides were washed 10 times with PBS and incubated with a 1:100 dilution in bovine serum albumin-PBS of the secondary antibody (Cy3-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G; Jackson ImmunoResearch). DAPI (TEBU) was added with the secondary antibody at a final concentration of 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The slides were washed ten times with PBS and then mounted in a Eukitt solution (Labonord). Fluorescence micrographs were recorded on a Zeiss Axioplan fluorescence microscope equipped with a 100 $\times$  ACHROPLAN oil immersion objective (numerical aperture, 1.25), a 50 W mercury lamp, and standard Cy3 and DAPI filter sets. Images were captured with an AxioCam digital video camera system (Zeiss) and processed with Adobe Photoshop version 5.0.

#### *Lipid vesicle reconstitution*

DOPC was prepared at a final concentration of 15 mM in 50 mM Tris-HCl (pH 8), 200 mM KCl, and 10% CHAPS, as previously described [22]. The concentration of FtsW, RodA, melibiose permease or anti-PBP2x rabbit antibodies was 0.65  $\mu\text{M}$  in 50 mM Tris-HCl (pH 8), 200 mM KCl. A 700-fold molar excess of DOPC was added to the proteins in a final volume of 64  $\mu\text{l}$ . Phospholipid vesicles were reconstituted by removal of the detergent by dialysis for 24 h at 4  $^{\circ}\text{C}$  against 50 mM Tris-HCl (pH 8), 200 mM KCl. The formation of proteoliposomes was assayed by membrane flotation.

#### *Membrane flotation*

After dialysis, the volume of the samples was adjusted to 0.36 ml of the same buffer containing 40% sucrose (w/v). A discontinuous gradient was formed by overlaying the sample with 0.182 ml of 40% sucrose, 0.182 ml of 35% sucrose, 0.364 ml of 20% sucrose, 0.545 ml of 10% sucrose, and 0.364 ml of 5% sucrose in the same buffer. Ultracentrifugation was performed in a TLS55 rotor at 193,832g for 16 h at 4  $^{\circ}\text{C}$ . Fractions of 0.4 ml were collected from the top to the bottom of the gradient and blotted onto a nitrocellulose membrane. FtsW, RodA, and melibiose permease were visualized with a mouse anti-His-tag antibody peroxidase conjugate, and the

rabbit anti-PBP2x antibody with an anti-rabbit IgG peroxidase conjugate.

## Results and discussion

### Overexpression of FtsW and RodA

The present study describes a procedure for the purification of FtsW and RodA from *S. pneumoniae*. Failure to purify recombinant solubilized FtsW from *M. tuberculosis* has been reported recently [17].

The *ftsW* and *rodA* genes from *S. pneumoniae* were amplified by PCR and cloned into the arabinose-inducible expression vector pARA14 [20] to give pARAW and pARARodA [19]. The plasmid pARA14 was chosen because the *araB* promoter allows the level of induction to be modulated by adjusting the concentration of arabinose [20]. Tight repression and controlled expression were essential features as cloning failed into vectors of the pET series with known leaky expression.

The following strains were transformed with pARAW: BL21 C+ (DE3) RP, DH5 $\alpha$ , MC1061, and B834. Bacterial growth and level of FtsW expression in each strain were monitored by optical density and Western blot analysis, respectively. In all strains except BL21 C+ (DE3) RP, growth was inhibited following the addition of arabinose (Fig. 1). The level of production depended greatly on the strain and was best in the BL21 C+ (DE3) RP cells. FtsW was also expressed in MC1061, although

to a lower degree, whereas very little FtsW was produced in B834 and DH5 $\alpha$ . The strain BL21 C+ (DE3) RP contains extra copies of the *argU* and *proL* genes. These genes encode tRNAs that recognize the Arg codons AGA and AGG and the Pro codon CCC. With a GC content of 40%, *S. pneumoniae* is an unlikely source of genes that would require extra copies of *argU* and *proL* for expression in *E. coli*. Indeed, our laboratory has expressed numerous other proteins from *S. pneumoniae* in *E. coli* without relying on extra tRNAs. However, in FtsW, 3 out of 17 Arg and 3 out of 11 Pro, and in RodA, 4 out of 17 Arg and 2 out of 10 Pro are encoded by these codons. These codons are moreover mostly in the 5' region of the two open reading frames, which might explain why poor expression and growth arrest were observed with other strains.

The temperature, the concentration of arabinose, the cell density at the time of induction, and the duration of induction were changed to optimize the production of FtsW in BL21 C+ (DE3) RP. FtsW expression was higher at 37 °C than at 30 °C or 16 °C. Different concentrations of arabinose were tested at 37 °C and, somewhat unexpectedly, the amount of protein produced was inversely proportional to the concentration of arabinose. This observation can be explained by a toxicity of FtsW overexpression. Indeed, the viability of the cells was significantly decreased at the higher arabinose concentration (data not shown). Although the overexpression of any membrane protein is often toxic, we cannot exclude the fact that FtsW from *S. pneumoniae* specifically interferes with the division machinery of *E. coli*. The induction was therefore initiated with 0.005% L-arabinose at the beginning ( $OD_{600nm} = 0.3$ ) or middle ( $OD_{600nm} = 0.5$ ) of the exponential growth, and at the start of the stationary phase ( $OD_{600nm} = 1.3$ ). A higher level of expression was observed when the induction was started at  $OD_{600nm} = 0.3$ . The level of FtsW production was then monitored at various time intervals ranging from 1 to 16 h after induction. Protein accumulation was maximal after 5–6 h. At later time points, the amount of protein decreased and was undetectable after overnight incubation. FtsW was thus produced by incubation for 5–6 h at 37 °C, following induction with 0.005% arabinose of BL21 C+ (DE3) RP cultures in early exponential phase.

Conditions for overexpression of RodA were derived from those adequate for FtsW. Temperature was 25 °C instead of 37 °C and the incubation following the addition of arabinose was reduced to 3 h. At 37 °C, RodA was produced as inclusion bodies. Production at 25 °C reduced the amount of RodA in inclusion bodies in favour of the membrane-addressed protein.

### Membrane localization of FtsW and RodA

The membrane localization of FtsW and RodA was checked by subcellular fractionation monitored by

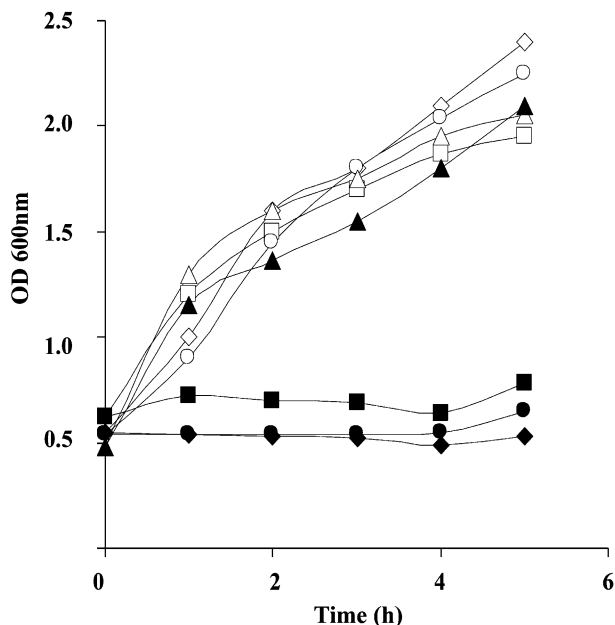


Fig. 1. Effect of induction of expression of FtsW on the growth of strains DH5 $\alpha$  (diamonds), MC1061 (squares), B834 (circles), and BL21 C+ (DE3) RP (triangles). Exponentially growing cells harbouring pARAW were incubated in the absence (open symbols) or the presence (closed symbols) of 0.005% arabinose added at time zero. OD 600 nm, optical density at 600 nm.

Western immunoblotting. The localization of recombinant FtsW was investigated further by immunofluorescence. Cells were lysed by sonication and cell debris were pelleted by low-speed centrifugation. Membranes were then collected by ultracentrifugation. A small amount of both FtsW and RodA was found in the low-speed pellet, but most of the protein (over 60%) was found in the membrane fraction, demonstrating that the N-terminal His-tag does not impede membrane addressing. It had been shown by complementation that *E. coli* FtsW tolerates the N-terminal fusion of the much bulkier green fluorescent protein [15].

Interestingly, observation of FtsW-producing cells by immunofluorescence revealed a heterogeneous population. Four different localization patterns of FtsW were observed when cultures were induced with 0.005% arabinose (Fig. 2), whereas no labelling was observed in the absence of inductor. Thirty-six percent of the cells expressing FtsW ( $n = 98$ ) exhibited homogeneous membrane localization of the recombinant protein (Fig. 2A). A punctuated localization of FtsW, possibly resulting from inefficient fixation or permeabilization, was observed in 22% of the cells (Fig. 2B). Forty-two percent of the cells displayed cell pole localization of FtsW, with an additional midcell localization in about 1/3 of these cells (Figs. 2C and D). The high intensity of the polar and midcell staining probably indicates the formation of inclusion bodies in a subset of cells. However, the localization at midcell is intriguing and suggests an alternative explanation, particularly as the DAPI staining always showed a septal constriction characteristic of dividing bacteria, and non-dividing cells did not display midcell localization of FtsW. Midcell localization may thus result from specific septal targeting and labelling at the poles may be due to residual FtsW from previous divisions. Endogenous *E. coli* FtsW shows similar localization patterns, although polar labelling is weaker than septal labelling [14]. The localization signal of

FtsW might thus be conserved in *S. pneumoniae* and *E. coli*, suggesting that complementation in *E. coli* might be attempted with pneumococcal SEDS. Cultures induced with 0.005% arabinose did not exhibit either growth perturbation (Fig. 1) or filamentous morphology (Fig. 2), indicating that midcell localization of pneumococcal FtsW does not interfere with *E. coli* cell division.

#### Membrane solubilization and protein purification

Membrane-associated proteins were solubilized by incubation with 1% LAPAO for 10 min at 4 °C [23,24]. After the removal of insoluble material by ultracentrifugation, solubilized proteins were analysed by Western immunoblotting. FtsW and RodA were both quantitatively solubilized.

Several milder detergents were tested to replace LAPAO, including CHAPS 0.6%, CHAPSO 0.6%, Triton X-100 0.13%, C12E5 0.35%, C12E8 0.05%, C12M 0.05%, and LDAO 0.05%. Aliquots of LAPAO-solubilized FtsW were bound on a Ni<sup>2+</sup>-affinity resin (Cheating Sepharose fast flow, Pharmacia) and eluted with buffer containing either of each detergent and 200 mM imidazole. Comparison by Western blot analysis of LAPAO-solubilized and eluted proteins showed that C12E8 was the most efficient at solubilizing FtsW after detergent exchange. Exchange of LAPAO for C12E8 was directly applied to the purification of RodA without further testing.

For larger scale purification, the solubilized proteins were applied on a Co<sup>2+</sup>-affinity resin. After extensive wash with a solution of Hepes 50 mM (pH 7), glycerol 10%, NaCl 300 mM, imidazole 10 mM, and C12E8 0.05%, elution of both proteins was obtained in the same buffer with 250 mM imidazole. Fractions were analysed by SDS-PAGE and His-tagged proteins were identified by western blot (Fig. 3). The molecular weights of His-tagged FtsW and RodA are 46,066 and 47,851 Da, respectively. As previously observed with FtsW [15], both proteins have an unusual migration on SDS-PAGE, with apparent molecular weights of 40 kDa for FtsW and 42 kDa for RodA. A greater amount of migrating proteins was observed when samples were kept at room temperature, prior to SDS-PAGE, than when samples were heated at 37 or 100 °C (data not shown). With both proteins, less aggregation occurred when migration was performed at 4 °C than at room temperature.

For both FtsW and RodA, about 3 mg proteins were expressed per liter of culture. About 67% or 2 mg FtsW or RodA was found in the membrane preparations. Finally, between 50 and 150 µg FtsW or RodA was purified depending on the preparation. The yield of the combined solubilization and chromatography steps was therefore comprised to be between 2.5 and 7.5%. The overall yield for both proteins was therefore comprised to be between 1.7 and 5%.

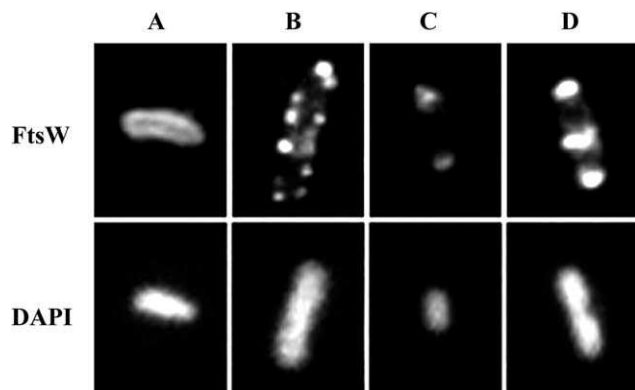


Fig. 2. Immunofluorescence micrographs of recombinant FtsW from *S. pneumoniae* overexpressed in *E. coli* BL21 C+ (DE3) RP. The cells display membranous (A), punctuated (B), polar (C) or polar, and midcell (D) localization of FtsW.

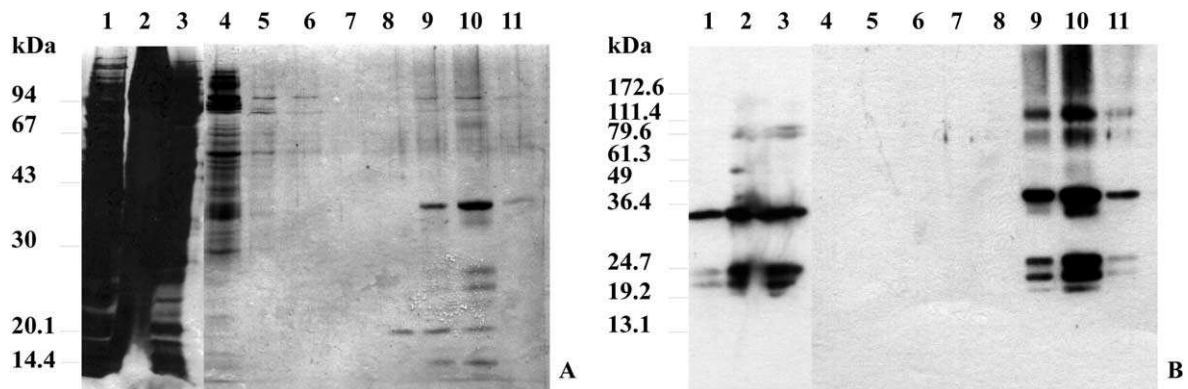


Fig. 3. Purification of His-tagged FtsW from *S. pneumoniae*. Purification was obtained by  $\text{Co}^{2+}$ -affinity chromatography. Proteins were separated on a 12.5% SDS-PAGE, silver stained (A) or immunoblotted (B). Lane 1, total cell extract from arabinose-induced *E. coli* cells (equivalent to 1  $\mu\text{l}$  culture); lane 2, membranes (11  $\mu\text{l}$  of 25 ml); lane 3, LAPAO-solubilized proteins (11  $\mu\text{l}$  of 25 ml); lanes 4–7, wash fractions with 50 mM Hepes (pH 7), 10% glycerol, 300 mM NaCl, 0.05% C12E8, and 10 mM imidazole (11  $\mu\text{l}$  of 2 ml); and lanes 8–11, elution fractions (11  $\mu\text{l}$  of 2 ml) with the same solution containing 50 mM (lane 8), 250 mM (lanes 9 and 10), and 300 mM imidazole (lane 11).

With both FtsW and RodA, proteins with an apparent molecular weight of around 24 kDa were copurified (Fig. 3). These polypeptides were also detected by anti-His-tag immunoblotting, indicating that they are C-terminally truncated forms of FtsW and RodA. Based on the topology of FtsW from *S. pneumoniae* recently described [19] and the apparent size of the truncated forms, the proteolytic cleavage could occur in the large extracytoplasmic loop between the transmembrane helices 7 and 8. Further experiments are necessary to identify this cleavage site.

#### Trypsin digestion of FtsW and RodA

Trypsin was added to FtsW and RodA in different protease to protein ratios and incubated 30 min at room temperature, prior to analysis by SDS-PAGE (Fig. 4). Truncated forms of FtsW and RodA were generated with high concentration of trypsin. These fragments

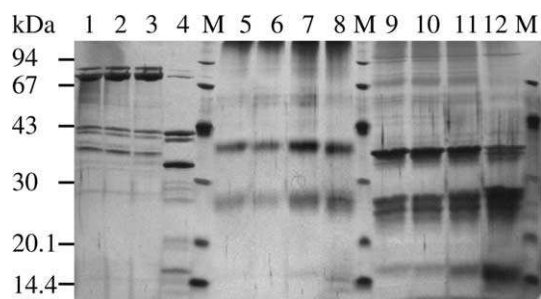


Fig. 4. Trypsin digestion of FtsW and RodA. Purified proteins (80 ng) of vPBP2x (lanes 1–4), RodA (lanes 5–8) or FtsW (lanes 9–12) were incubated 30 min at room temperature, without (lanes 1, 5, and 9) or with trypsin at the following trypsin/protein ratios: 1/1000 (lanes 2, 6, and 10); 1/100 (lanes 3, 7, and 11); and 1/10 (lanes 4, 8, and 12). Digestions were analysed by 12.5% SDS-PAGE and silver stained. Lanes M, molecular weight markers.

were also detected by anti-His-tag immunoblotting (data not shown) and had electrophoretic mobilities comparable to those of the fragments copurified with the full-length proteins. The relative resistance to trypsin digestion of FtsW and RodA (full-length and truncated) suggests that both proteins are likely folded in detergent. As control for both sensitivity and resistance to tryptic digestion, a soluble form of a variant of PBP2x from *S. pneumoniae* was submitted to the same proteolytic conditions. This variant PBP2x has a single trypsin sensitive site, which generates two trypsin resistant fragments (A. Zapun, unpublished observation).

#### Membrane insertion of FtsW and RodA

Purified C12E8-solubilized FtsW and RodA were dialysed in the presence or the absence of DOPC lipids to reconstitute proteoliposomes. The incorporation into membranes was checked by floatation on a discontinuous sucrose gradient analysed by dot blot with an anti-His-tag antibody peroxidase conjugate (Fig. 5). In the absence of added lipids, FtsW and RodA alone were detected mostly at the bottom of the sucrose gradient. In the presence of DOPC lipids, both FtsW and RodA were found to float in the gradient, thus demonstrating the near complete incorporation into membranes. In control experiments, melibiose permease, a well-characterized transmembrane protein with 12 trans-membrane helices [25], displayed similar behaviour, whereas a soluble antibody was detected mostly in the bottom fraction in the presence or the absence of lipid.

In summary, we have described the overexpression, membrane localization in *E. coli*, and purification of two homologous membrane proteins from *S. pneumoniae*. Solubilization was performed with LAPAO and purification of His-tagged protein was achieved by  $\text{Co}^{2+}$ -affinity chromatography after detergent exchange for

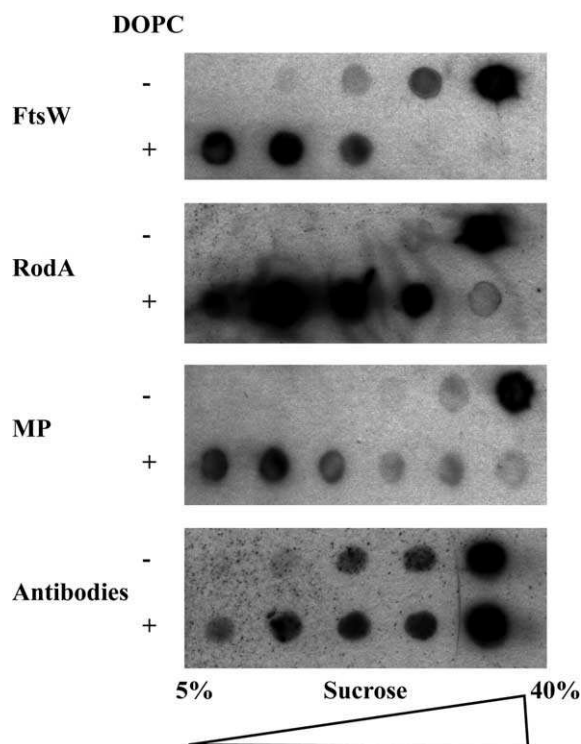


Fig. 5. Membrane flotation of FtsW and RodA. Purified proteins were dialysed in the presence or the absence of DOPC lipids and analysed by ultracentrifugation on a discontinuous sucrose gradient (5–40%). MP, melibiose permease. Fractions of the sucrose gradient were analysed by dot blot with an anti-His-tag antibody peroxidase conjugate (FtsW, RodA, and MP) or an anti-rabbit antibody peroxidase conjugate (anti-PBP2x antibodies).

C12E8. Both proteins could be incorporated into lipid vesicles, thus opening the way to further investigation of their putative biochemical function and interaction with class B PBPs.

### Acknowledgments

We thank Dr. G. Brandolin for the generous gift of LAPAO. Dr. G. Leblanc is acknowledged for providing essential advice and assistance, as well as melibiose permease. M.N.-S. was supported by a grant from Aventis (GIP HMR) and C.M. by a CFR fellowship from CEA.

### References

- [1] M. Ikeda, T. Sato, M. Wachi, H.K. Jung, F. Ishino, Y. Kobayashi, M. Matsuhashi, Structural similarity among *Escherichia coli* FtsW and RodA proteins and *Bacillus subtilis* SpoVE protein, which function in cell division, cell elongation, and spore formation, respectively, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 6375–6378.
- [2] B. Joris, G. Dive, A. Henriques, P.J. Piggot, J.M. Ghuysen, The life-cycle proteins RodA of *Escherichia coli* and SpoVE of *Bacillus subtilis* have very similar primary structures, *Mol. Microbiol.* 4 (1990) 513–517.
- [3] A.O. Henriques, P. Glaser, P.J. Piggot, C.P. Moran Jr., Control of cell shape and elongation by the *rodA* gene in *Bacillus subtilis*, *Mol. Microbiol.* 28 (1998) 235–247.
- [4] M. Matsuhashi, M. Wachi, F. Ishino, Machinery for cell growth and division: penicillin-binding proteins and other proteins, *Res. Microbiol.* 141 (1990) 89–103.
- [5] S.A. Denome, P.K. Elf, T.A. Henderson, D.E. Nelson, K.D. Young, *Escherichia coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 3981–3993.
- [6] M. Matsuhashi, in: J.M.G.a.R. Hakenbeck (Ed.), *Bacterial Cell Wall*, Elsevier, Amsterdam, 1994, pp. 55–102.
- [7] S. Tamaki, H. Matsuzawa, M. Matsuhashi, Cluster of *mrdA* and *mrdB* genes responsible for the rod shape and mecillinam sensitivity of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 141 (1980) 52–57.
- [8] B.G. Spratt, Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2999–3003.
- [9] P. Canepari, G. Botta, G. Satta, Inhibition of lateral wall elongation by mecillinam stimulates cell division in certain cell division conditional mutants of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 157 (1984) 130–133.
- [10] S. Matsuhashi, T. Kamiryo, P.M. Blumberg, P. Linnett, E. Willoughby, J.L. Strominger, Mechanism of action and development of resistance to a new amidino penicillin, *J. Bacteriol.* 117 (1974) 578–587.
- [11] F. Ishino, W. Park, S. Tomioka, S. Tamaki, I. Takase, K. Kunugita, H. Matsuzawa, S. Asoh, T. Ohta, B.G. Spratt, et al., Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and rodA protein, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 7024–7031.
- [12] M.M. Khattar, K.J. Begg, W.D. Donachie, Identification of FtsW and characterization of a new *ftsW* division mutant of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 7140–7147.
- [13] W. Margolin, Themes and variations in prokaryotic cell division, *FEMS Microbiol. Rev.* 24 (2000) 531–548.
- [14] L. Wang, M.K. Khattar, W.D. Donachie, J. Lutkenhaus, FtsI and FtsW are localized to the septum in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 2810–2816.
- [15] K.L. Mercer, D.S. Weiss, The *Escherichia coli* cell division protein FtsW is required to recruit its cognate transpeptidase, FtsI (PBP3), to the division site, *J. Bacteriol.* 184 (2002) 904–912.
- [16] D.S. Boyle, M.M. Khattar, S.G. Addinall, J. Lutkenhaus, W.D. Donachie, *ftsW* is an essential cell-division gene in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 24 (1997) 1263–1273.
- [17] P. Datta, A. Dasgupta, S. Bhakta, J. Basu, Interaction between FtsZ and FtsW of *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 24983–24987.
- [18] K. Ehlert, J.V. Holtje, Role of precursor translocation in coordination of murein and phospholipid synthesis in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 6766–6771.
- [19] P. Gérard, T. Vernet, A. Zapun, Membrane topology of the *Streptococcus pneumoniae* FtsW division protein, *J. Bacteriol.* 184 (2002) 1925–1931.
- [20] C. Cagnon, V. Valverde, J.M. Masson, A new family of sugar-inducible expression vectors for *Escherichia coli*, *Protein Eng.* 4 (1991) 843–847.
- [21] E.J. Harry, K. Pogliano, R. Losick, Use of immunofluorescence to visualize cell-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 3386–3393.
- [22] A.M. Di Guilmi, N. Mouz, L. Martin, J. Hoskins, S.R. Jaskunas, O. Dideberg, T. Vernet, Glycosyltransferase domain of penicillin-binding protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* is membrane associated, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 2773–2781.
- [23] G. Brandolin, J. Doussiere, A. Gulik, T. Gulik-Krzywicki, G.J. Lauquin, P.V. Vignais, Kinetic, binding and ultrastructural



properties of the beef heart adenine nucleotide carrier protein after incorporation into phospholipid vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 592 (1980) 592–614.

[24] T. Pourcher, S. Leclercq, G. Brandolin, G. Leblanc, Melibiose permease of *Escherichia coli*: large scale purification and evidence

that  $H^+$ ,  $Na^+$ , and  $Li^+$  sugar symport is catalyzed by a single polypeptide, *Biochemistry* 34 (1995) 4412–4420.

[25] T. Pourcher, E. Bibi, H.R. Kaback, G. Leblanc, Membrane topology of the melibiose permease of *Escherichia coli* studied by *melB-phoA* fusion analysis, *Biochemistry* 35 (1996) 4161–4168.