



HAL
open science

Études biochimiques et cellulaires de tyrosine-kinases bactériennes

Julien Nourikyan

► **To cite this version:**

Julien Nourikyan. Études biochimiques et cellulaires de tyrosine-kinases bactériennes. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10307 . tel-01214517

HAL Id: tel-01214517

<https://theses.hal.science/tel-01214517>

Submitted on 12 Oct 2015

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.

N° d'ordre :

Année 2014

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCE-SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 19 Décembre 2014

par

M. Julien NOURIKYAN

TITRE :

**ETUDES BIOCHIMIQUES ET CELLULAIRES DE
TYROSINE-KINASES BACTERIENNES**

Directeur de thèse :

Dr. GRANGEASSE Christophe

JURY :	M. le Pr. Gilbert Deléage	Président
	Mme la Dr. Anne Galinier	Rapporteur
	M. le Pr. Ivan Mijakovic	Rapporteur
	Mme la Dr. Marie-Françoise Noirot-Gros	Examineur
	Mme la Pr. Sylvie Nessler	Examineur
	M. le Dr. Christophe Grangeasse	Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud –

Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme Caroline FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. Georges TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. C. VITON

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

RESUME EN FRANÇAIS

Les bactéries possèdent une famille particulière de tyrosine-autokinases, les BY-kinases. Ces enzymes sont impliquées dans la régulation de plusieurs processus cellulaires dont la synthèse et l'export des polysaccharides extracellulaires qui jouent un rôle crucial dans la virulence de certaines bactéries pathogènes. Cependant, les mécanismes de régulation sous-jacents sont inconnus.

L'objectif de ma thèse a été de caractériser d'un point de vue structural et fonctionnel le rôle des BY-kinases. Pour cela, j'ai réalisé trois études indépendantes dans trois modèles bactériens différents. Chez *Escherichia coli*, j'ai identifié et étudié la surface d'interaction entre la BY-kinase Wzc et sa phosphatase associée Wzb afin de comprendre comment Wzb déphosphoryle Wzc. Chez *Staphylococcus aureus*, j'ai participé à la caractérisation structurale de la pseudo-BY-kinase CapB1. Par comparaison avec la structure de son homologue actif CapB2, mes études ont permis de suggérer l'existence d'un mécanisme de régulation de la synthèse des polysaccharides extracellulaires impliquant CapB2 et CapB1. Enfin, chez *Streptococcus pneumoniae*, j'ai mis en évidence que si l'autophosphorylation de la BY-kinase CpsD était indispensable à la synthèse de la capsule polysaccharidique, elle était également indispensable à la division de la cellule. Ainsi, mes travaux ont permis de proposer l'existence d'un mécanisme de coordination de la production de la capsule et du cycle cellulaire du pneumocoque.

D'un point de vue appliqué, l'ensemble de mes travaux représente une étape préalable et prometteuse au développement de nouvelles molécules, ciblant les BY-kinases de manière spécifique, afin de lutter contre la virulence de certaines bactéries pathogènes.

TITRE EN ANGLAIS

Biochemical and cellular studies of bacterial tyrosine-kinases

RESUME EN ANGLAIS

Bacteria possess a particular family of tyrosine-autokinases named BY-kinases. These enzymes are involved in the regulation of numerous cellular functions including the synthesis and export of extracellular polysaccharides that play a critical role in the virulence of different bacterial pathogens. However, the mechanisms of these processes remain unknown.

The aim of my thesis was to characterize the role of these BY-kinases by structural and functional approaches. For that, I have realized three independent studies in three bacterial models. In *Escherichia coli*, I have characterized the interaction surface between the BY-kinase Wzc and its cognate phosphatase Wzb to understand how Wzb dephosphorylates Wzc. In *Staphylococcus aureus*, I have studied structurally the pseudo-BY-kinase CapB1. By comparison with the structure of its active homologue CapB2, my studies have allowed to suggest the existence of a mechanism controlling capsular polysaccharides synthesis involving both CapB1 and CapB2. Last, in *Streptococcus pneumoniae*, I have showed that while the autophosphorylation of the BY-kinase CpsD is necessary for proper synthesis of capsular polysaccharides, it is also involved in cell division. Thus, my work shows that a mechanism coordinating capsule production and cellular cycle exists in the pneumococcus.

These works constitute a preliminary and promising step toward the development of new molecules, targeting specifically BY-kinases and aim to combat the virulence of bacterial pathogens.

DISCIPLINE

Microbiologie – Biochimie – Biologie cellulaire des procaryotes

MOTS-CLES

Tyrosine-kinase bactérienne (BY-kinase), phosphotyrosine-phosphatase, polysaccharide capsulaire, division cellulaire, ségrégation du chromosome, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux – UMR 5086 – CNRS/UCBL
7, passage du Vercors, 69367 LYON Cedex 07, FRANCE

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés dans l'équipe « Bactéries Pathogènes et Phosphorylation des Protéines » hébergée au sein l'UMR 5086 « Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux » de Lyon et dirigée par le Dr. Christophe Grangeasse.

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement le Dr Anne Galinier et le Pr Ivan Mijakovic d'avoir accepté de juger mon travail de thèse ainsi que le Pr. Gilbert Deléage qui a accepté de diriger ce jury. Je remercie également le Dr. Marie-Françoise Noiro-Gros et le Pr. Sylvie Nessler pour leur participation à ce jury. Un grand merci pour votre présence à une semaine des fêtes de Noël !

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, le Dr. Marie-Françoise Noiro-Gros et le Dr. Laurent Terradot pour avoir accepté de participer à ce comité et pour leurs conseils précieux.

Je remercie nos collaborateurs, le Dr. Ranajeet Ghose pour les expériences de résonance magnétique nucléaire, le Pr Sylvie Nessler pour celles de cristallographie et le Dr Marie-Françoise Noiro-Gros pour les approches de double-hybride en système levure. Je remercie également le Dr Jan-Willem Veening pour son expertise en microscopie à haute résolution TIRF.

J'ai eu la chance d'intégrer une équipe dynamique et agréable. Durant ma thèse j'ai ainsi fait des rencontres très enrichissantes à différents points de vue. Tout d'abord, je souhaiterai remercier très chaleureusement mon directeur de thèse, le Dr. Christophe Grangeasse, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et surtout pour m'avoir supporté durant toutes ces années. Ta motivation et ton engagement sans faille m'ont toujours impressionné. La dynamique du laboratoire est en très grande partie due à ton côté passionné que tu sais nous transmettre. Au-delà d'un chef, j'ai rencontré quelqu'un que j'apprécie énormément. Merci pour ton excellent encadrement, ta disponibilité et tes conseils. Je pars avec des souvenirs plein la tête. Ton « chien fou » s'en va mais tu n'as pas fini d'en entendre parler...

Mes remerciements se tournent maintenant vers l'ensemble de l'équipe. Ma thèse n'aurait pas été si agréable sans vous. Nos débats sans fin, nos fous rires, nos célébrations, etc... me manqueront énormément. J'espère, au plus profond de moi, retrouver une équipe comme la vôtre dans mon avenir proche. Je remercie donc le Pr. Alain J. Cozzone qui a su m'apprendre en temps et en heure à mettre le poing dans ma poche, le Dr. Jean-Pierre Lavergne pour l'ensemble des discussions sur le sujet CpsD, sur les expériences de biochimie en général et pour avoir supporté l'éclosion des « IBCP ducks ». Je n'oublierai jamais que tu m'as dit un jour que j'avais raison sur un sujet politique. Merci également au Dr. Sébastien Guiral pour son apport sur la

génétiq ue du pneumocoque et pour nos débats qui m'ont plus souvent fait rire que changer d'avis...Et oui je suis sans espoir...

Ma petite Fleurie, j'ai adoré les années passées ensemble. Ta joie de vivre et ton dynamisme m'ont permis de franchir certains caps difficiles de ma thèse. Avec mon départ, plus aucun représentant des « IBCP ducks » ne sera présent...ça va manquer de chants mélodieux... Je ne peux te remercier sans souligner ta descente historique qui a engendré quelques trous dans ma cave... Je te remercie vraiment pour ce que tu es, ne change rien. Bonne chance pour la suite. Sylvinounette, te voilà la dernière représentante du trio. Malgré tous mes efforts, j'aurai échoué dans ton apprentissage des rudiments du badminton... Merci à toi aussi pour tes éclats de rire qui raisonnent à l'autre bout de l'institut mais qui font tellement de bien à entendre. Je me souviendrai toujours de cette petite master qui est arrivée en disant : « Moi je ne veux pas faire de thèse, je veux écrire des articles scientifiques... » et qui s'est révélée passionnée par la recherche, grosse bosseuse et qui va partir avec un petit Nature dans la poche...Pas mal !!! Je vous remercie toutes les deux d'avoir été des oreilles attentives et rassurantes durant mes coups de moins bien. Je remercie également la petite Zuchette qui a su faire des efforts au niveau de sa susceptibilité pour accepter mes diverses remarques quelques fois désagréables j'en conviens.

Je tiens également à remercier Caroline pour son aide en microscopie électronique. Alors on la voit cette capsule ou pas ? Céline qui me soutenait dans mes crises de rangements et propreté, Clément pour son humour, Chao pour nos grandes discussions autour des bières du Ninkasi, Marie pour son apport sur le sujet CpsD durant son Master et Chryslène qui va prendre la relève de ce sujet difficile mais passionnant. Bonne chance à tous les nouveaux. Faites en sorte de ne pas oublier que bonne science et bonne ambiance sont nécessaire à votre épanouissement.

Je remercie l'ensemble du personnel de l'IBCP et plus particulièrement Jérémy et Thomas pour nos nombreuses discussions autour d'un café ou d'une cigarette.

Enfin je remercie mes amis et ma famille qui ont dû composer avec mes absences répétées mais qui sont toujours restés à mes côtés. Maintenant que je vais être disponible, je ne sais pas si vous allez encore me supporter.

Merci à ma chérie, je sais que je n'ai pas beaucoup été présent ces dernières années mais tu as tenu le coup. Tu dois être sacrément amoureuse... Je te promets de faire en sorte d'être plus disponible dans les années à venir, ici ou ailleurs...

Sommaire

Abréviations	15
Introduction	19
Exposé bibliographique	29
I Les tyrosine-kinases bactériennes	31
I.1 Découverte de la phosphorylation sur la tyrosine chez les bactéries	31
I.2 La première tyrosine-kinase bactérienne : Ptk d' <i>Acinetobacter johnsonii</i>	31
I.3 Une nouvelle famille de protéines : les BY-kinases	32
I.4 Etudes structurales des BY-kinases	35
I.4.i Chez les firmicutes	35
I.4.ii Chez les protéobactéries	37
I.5 Rôles cellulaires des BY-kinases	42
I.5.i La synthèse et l'export des polysaccharides extracellulaires	42
I.5.ii Autres processus régulés par les BY-kinases	44
I.6 Régulation de la phosphorylation des BY-kinases	48
II Les polysaccharides extracellulaires	50
II.1 Présentation générale	50
II.1.i Définition	50
II.1.ii Rôles physiologiques des polysaccharides extracellulaires	51
II.2 Mécanismes de biosynthèse et d'export des polysaccharides extracellulaires	52
II.2.i Le système Wzy-dépendant	52
II.2.ii Le système ABC-transporteur-dépendant	53
II.3 La capsule polysaccharidique de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	54
II.3.i Composition chimique de la capsule polysaccharidique de type 2	55
II.3.ii Organisation et régulation génétique	55
II.3.iii Voie de biosynthèse de la capsule polysaccharidique de type 2	56
III La division bactérienne	60
III.1 Le fonctionnement du divisome	61
III.1.i La synthèse du peptidoglycane	62
III.1.ii La constriction du septum	65
III.1.iii La séparation des cellules filles	67
III.2 Le positionnement du divisome	68
III.2.i Le système Min	69
III.2.ii Le système Noc	70
III.2.iii Autres systèmes	71
III.3 La ségrégation du chromosome	72
III.4 Autres protéines importantes	74

Etude du rôle de l'autophosphorylation de la tyrosine-kinase bactérienne CpsD dans la coordination de la synthèse de la capsule polysaccharidique et la division cellulaire chez <i>Streptococcus pneumoniae</i>	77
I Matériels et méthodes	79
I.1 Cultures bactériennes	79
I.1.i Souches bactériennes et conditions de culture	79
I.1.ii Courbes de croissance du pneumocoque	82
I.2 Techniques de biologie moléculaire	82
I.2.i Purification de plasmides	82
I.2.ii Amplification d'un fragment d'ADN	82
I.2.iii Analyse électrophorétique des fragments d'ADN sur gel d'agarose.....	86
I.2.iv Test d'interaction avec l'ADN.....	86
I.2.v Extraction des fragments d'ADN d'un gel d'agarose.....	86
I.2.vi Digestion par des endonucléases de restriction	86
I.2.vii Technique de ligation	87
I.2.viii Transformation bactérienne	87
I.2.ix Construction des mutants de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	88
I.2.x Le système double-hybride en système levure	90
I.2.xi Contrôle des clones par séquençage	92
I.3 Techniques de biochimie	92
I.3.i Préparation des échantillons protéiques de <i>S. pneumoniae</i>	92
I.3.ii Surproduction de protéines recombinantes.....	93
I.3.iii Purification de protéines fusionnées à une étiquette 6-histidines.....	93
I.3.iv Co-immunoprécipitation	94
I.3.v Dosage des protéines.....	95
I.3.vi Analyse sur gel de polyacrylamide	95
I.3.vii Transfert et immunodétection.....	96
I.3.viii La thermophorèse	97
I.4 Techniques de microscopie.....	98
I.4.i Microscopie optique	98
I.4.ii Microscopie électronique à transmission.....	99
I.5 Tests de virulence	100
II Résultats.....	101
II.1 L'autophosphorylation de CpsD est contrôlée par l'extrémité C-terminale de CpsC ...	101
II.2 L'interaction CpsC/CpsD est nécessaire à la synthèse septale de CPS	102
II.3 Localisation de CpsD.....	103

II.4 Localisation de CpsH, la polymérase des polysaccharides capsulaires.....	104
II.5 L'autophosphorylation de CpsD est nécessaire à la localisation de CpsH et à la synthèse de CPS au septum de la bactérie.	107
II.6 L'autophosphorylation de CpsD impacte la taille des cellules du pneumocoque	108
II.7 La constriction de la cellule dépend de l'état de phosphorylation de CpsD.....	110
II.8 La ségrégation de l'ADN chromosomique dépend de l'état de phosphorylation de CpsD	113
II.9 CpsD agit sur la mobilité de la protéine ParB	115
II.10 CpsD interagit avec la protéine ParB	117
II.11 La virulence du pneumocoque dépend de l'état de phosphorylation de CpsD	121
Analyse comparative de l'activation des tyrosine-kinases CapB1 et CapB2 par leurs modulateurs transmembranaires CapA1 et CapA2 chez <i>Staphylococcus aureus</i>	123
Etude de l'interaction entre la tyrosine-kinase Wzc et sa phosphatase associée Wzb chez <i>Escherichia coli</i>	139
Discussion & conclusions	161
Références bibliographiques	173

Abréviations

°C : degré(s) Celsius
ABC : cassette liant l'ATP
Abs_x : absorbance à x nm
AD : domaine d'activation de la transcription
ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
ATP : adénosine 5'-triphosphate
BD : domaine de liaison à l'ADN
BSA : albumine de sérum bovin
BY-kinase : tyrosine-kinase bactérienne
CaCl₂ : chlorure de calcium
cfu : unité de formation de colonie
CPS : polysaccharide capsulaire
CSP : peptide stimulant la compétence
Da : Dalton
DMSO : diméthyle sulfoxyde
DOC : désoxycholate
DTT : dithiothréitol
EDTA : acide éthylène diamine tétracétique
EPS : exopolysaccharide
g : gramme(s)
g : gravité en m/s²
GFP : protéine fluorescente verte
GluNAc : N-acétyl-glucosamine
GTP : guanosine 5'-triphosphate
h : heure(s)
HCl : chlorure d'hydrogène
IPTG : isopropyle β-D-1-thiogalactopyranoside
Kan^R : résistance à la kanamycine
kb : kilopaire de bases
KCl : chlorure de potassium
KH₂PO₄ : phosphate de potassium monobasique
L : litre(s)
LB : milieu de Luria-Bertani
LMW-PTP : phosphotyrosine-phosphatase de basse masse moléculaire
M : mole(s) par litre
MEB : microscopie électronique à balayage
MET : microscopie électronique à transmission
MgCl₂ : chlorure de magnésium
MgSO₄ : sulfate de magnésium
min : minute(s)
MurNAc : acide N-acétyl-muramique

NaCl : chlorure de sodium
Na₂HPO₄ : hydrogénophosphate de sodium
Ni²⁺-NTA : nickel- acide nitrilotriacétique
OPX : protéine permettant l'export du polysaccharide au travers de la membrane externe
pb : paire de bases
PBS : tampon phosphate salin
PBP : protéine liant la pénicilline
PCP : polysaccharide co-polymérase
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PEG : polyéthylène glycol
PHP : polymérase et histidinol phosphatase
PTP : phosphotyrosine-phosphatase
PVDF : fluorure de polyvinylidène
qsp : quantité suffisante pour
RFP : protéine fluorescente rouge
RK : séquence riche en résidus arginyles et lysyles
RMN : résonance magnétique nucléaire
SDS : dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
sfGFP : protéine fluorescente verte super-enroulée
STPK : sérine/thréonine protéine-kinase
Str^R : résistance à la streptomycine
TBS-T : tampon salin contenant du Tris-HCl et additionné de Tween 20
TEMED : tétraméthyléthylènediamine
Tet^R : résistance à la tétracycline
THY : milieu de Todd-Hewitt additionné d'extraits de levure
und-P : undécaprényl-phosphate
und-PP : undécaprényl-pyrophosphate
UV : ultra-violet
V : volt(s)
YC : cluster de tyrosine

Introduction

Les bactéries sont des organismes unicellulaires constituant l'une des plus simples et des plus anciennes formes de vie sur Terre. Certaines d'entre-elles sont indispensables à la survie de l'espèce humaine tandis que d'autres conduisent à des infections parfois mortelles. La découverte et la production des premiers antibiotiques dans les années 40 ont permis de lutter contre ces bactéries. Néanmoins, certaines sont devenues résistantes à ces traitements. Il est aujourd'hui montré que ces phénomènes de résistance sont dus à leur capacité à s'adapter continuellement à leur environnement par mutation et réorganisation de leur matériel génétique, d'acquisition de nouveaux caractères génétiques mais également par modifications post-traductionnelles des protéines. Concernant ces dernières, si l'acétylation, la glycosylation ou encore la méthylation des protéines chez les bactéries ont été décrites relativement récemment (Kobir *et al.*, 2011), la phosphorylation des protéines bactériennes est reconnue depuis plusieurs années comme un mécanisme important d'adaptation des bactéries à leur environnement (Cozzone, 1988).

Contrairement aux organismes Eucaryotes, pour lesquels les enzymes catalysant la phosphorylation sont réunies au sein d'une seule et même famille (Hanks *et al.*, 1988), il existe plusieurs systèmes de phosphorylation chez les bactéries. Ces systèmes se distinguent de par la nature de l'acide aminé modifié par phosphorylation, les enzymes catalysant cette réaction ou encore la nature du donneur phosphate.

Le premier des systèmes de phosphorylation bactériens est le « système à deux composants » (2CS). Ce système ATP-dépendant intervient dans les mécanismes de transduction du signal utilisés par la plupart des bactéries afin de percevoir les modifications de leur environnement et s'y adapter (Bourret *et al.*, 1989 ; Stock *et al.*, 2000). Dans ce système, et d'une façon générale, une protéine « senseur » détecte un stimulus extérieur conduisant à son autophosphorylation au niveau d'un résidu histidyle. Ce signal est transmis à une seconde protéine « effectrice » par une réaction de phospho-transfert au niveau d'un résidu aspartyle (Bourret *et al.*, 1989). Cette dernière peut alors initier la réponse cellulaire en favorisant, généralement, la transcription de certains gènes. Ce système intervient dans la régulation d'un grand nombre de fonctions cellulaires telles que le chimiotactisme (Bischoff and Ordal, 1991), la compétence (Weinrauch *et al.*, 1991), la sporulation (Burbulys *et al.*, 1991), la virulence (Leroux *et al.*, 1987) ou l'assimilation de l'azote (Magasanik, 1988).

Le second système de phosphorylation bactérien est le système phosphoénolpyruvate/sucre phosphotransférase (ou PTS). Ce système permet la régulation du taux de sucre à l'intérieur de la cellule. Suite à la fixation du sucre sur une protéine réceptrice, entraînant la production d'un signal chimiotactique intracellulaire, celui-ci est transporté à l'intérieur de la bactérie et est phosphorylé au dépend d'une molécule de phosphoénolpyruvate. Ce phénomène est le résultat d'une cascade de phosphorylations faisant intervenir différentes protéines transitoirement phosphorylées sur des résidus histidyles ou cystéinyles. Certaines de ces protéines peuvent également être phosphorylées par d'autres protéine-kinases (comme l'HPK-kinase/phosphorylase mentionnée ci-dessous) et participer à la régulation de nombreuses fonctions telles que la virulence ou encore le métabolisme du carbone chez les bactéries (Deutscher *et al.*, 2006).

Il faut néanmoins noter que ces deux systèmes ne sont pas exclusivement procaryotes. En effet, des systèmes similaires au système à deux composants ont été identifiés chez différents organismes eucaryotes tels que le végétal *Arabidopsis thaliana*, dans lequel ce système joue un rôle dans la régulation de l'utilisation de l'éthylène (Chang et Meyerowitz, 1995), ou la levure *Saccharomyces cerevisiae*, dans laquelle il intervient dans la régulation d'une cascade de MAP-kinases impliquées dans l'osmorégulation (Ota et Varshavsky, 1993). De plus, le système PTS a été retrouvé chez certains organismes supérieurs tels que les champignons. Par exemple, une protéine présentant des similitudes avec HPrK/P a été identifiée chez le champignon *Aspergillus fumigatus* (Barker *et al.*, 1991).

Le troisième et dernier de ces systèmes est apparenté au système ATP/GTP-dépendant retrouvé chez les Eucaryotes. Ce système est caractérisé par le transfert du groupement phosphate en γ de l'ATP sur des résidus séryles, thréonyles ou encore tyrosyles. Cependant, là encore, les bactéries ont montré leur capacité d'adaptation en étant capables de produire différents types de protéine-kinases pour catalyser ces réactions de phosphorylation.

La présence de protéines phosphorylées sur des résidus séryles et thréonyles a été observée pour la première fois vers la fin des années 70 chez les bactéries *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* (Manai et Cozzone, 1979 ; Wang et Koshland, 1978). Cependant, malgré ces caractérisations, la phosphorylation chez les procaryotes est longtemps restée un sujet de controverse. Les deux premières sérine-kinases détectées chez les bactéries n'ont été

identifiées qu'au début des années 80, il s'agit de l'HPr-kinase/phosphorylase (HPrK/P) chez *Bacillus subtilis* (Garnak et Reeves, 1979) et de l'isocitrate-déshydrogénase-kinase/phosphatase (IDHK/P) chez *E. coli* (Deutscher et Saier, 1983). Ces kinases ne possèdent aucune similarité structurale avec les sérine/thréonine-kinases retrouvées chez les Eucaryotes. De plus, elles possèdent une activité phosphatase ou phosphorylase en plus de leur activité kinase. Ce n'est qu'au début des années 90, que la première sérine/thréonine-kinase bactérienne de type eucaryote a été identifiée : Pkn1 chez *Myxococcus xanthus* (Munoz-Dorado *et al.*, 1991). Depuis, des programmes internationaux de séquençage de génomes bactériens ont démontré l'existence d'un grand nombre de gènes codant pour des sérine/thréonine-kinases de type eucaryote (STPK) dans les différents phyla bactériens (Kennely, 2002). La ressemblance entre ces protéine-kinases bactériennes et leurs homologues eucaryotes est essentiellement basée sur des similarités de séquence ainsi que structurales au niveau de leur domaine catalytique. En effet, le domaine catalytique des STPKs est constitué de 250 à 300 acides aminés et comprend la plupart des 11 sous-domaines de Hanks typiques des protéine-kinases eucaryotes (Hanks *et al.*, 1988). Les motifs de Hanks sont impliqués dans la liaison et l'orientation de la molécule donneuse de phosphate (ATP ou GTP), de la protéine ou du peptide substrat ainsi que dans le transfert du phosphate γ de l'ATP, ou du GTP, sur le résidu accepteur de la protéine substrat. De nombreuses études récentes ont démontré que ces protéine-kinases de type eucaryote jouent un rôle important dans différents processus tels que la virulence, la résistance à certains antibiotiques ou encore la division cellulaire (Ohlsen et Donat, 2010 ; Molle *et al.*, 2010 ; Fleurie *et al.*, 2012).

De façon surprenante, les programmes de séquençages de génomes bactériens n'ont pas vraiment permis d'identifier de tyrosine-kinases de type eucaryote. Malgré la détection de phosphotyrosines dans des extraits totaux bactériens et la caractérisation de WaaP (Zhao et Lam, 2002) et MasK (Thomasson *et al.*, 2002), deux tyrosine-kinases possédant quelques signatures des tyrosine-kinases eucaryotes, la phosphorylation des protéines sur les résidus tyrosyles a longtemps été considérée comme l'apanage des cellules eucaryotes. Néanmoins, il a récemment été suggéré que certaines STPKs eucaryotes pouvaient avoir une activité tyrosine-kinase (Kusebauch *et al.*, 2014). La présence de tyrosine-kinases bactériennes a été mise en évidence pour la première fois à la fin des années 90 avec la caractérisation de Ptk chez *Acinetobacter johnsonii* (Grangeasse *et al.*, 1997). De manière très intéressante, ces tyrosine-kinases bactériennes ne ressemblent pas aux tyrosine-kinases eucaryotes et ne présentent aucune homologie de séquence. Depuis cette première caractérisation, plusieurs autres tyrosine-kinases

homologues à Ptk ont été identifiées chez les bactéries donnant ainsi naissance à une nouvelle famille de tyrosine-kinases, propre aux bactéries, appelée BY-kinases (Bacterial tYrosine-kinases).

L'analyse de la séquence en acides aminés des BY-kinases a montré la présence de motifs de Walker A, A' et B habituellement retrouvés chez les protéines telles que les ATPases et les GTPases (Leipe *et al.*, 2002) (**Fig. 1**). Ces motifs sont essentiels à l'activité catalytique des BY-kinases (Doublet *et al.*, 1999). Par conséquent, la fonction tyrosine-kinase des BY-kinases n'avait jamais pu être considérée auparavant car elles avaient rapidement été classées comme des ATPases. Les BY-kinases sont également caractérisées par la présence d'une séquence riche en tyrosines (tyrosine-cluster, YC), en position C-terminale du domaine cytoplasmique (**Fig. 1**). Les tyrosines présentes dans ce motif sont la cible de l'autophosphorylation des BY-kinases *via* un mécanisme intermoléculaire (transphosphorylation).

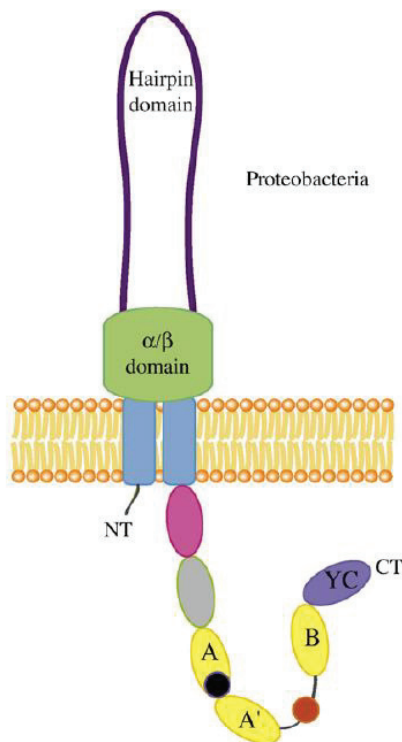


Figure 1 : Organisation générale des BY-kinases

Les domaines transmembranaires sont colorés en bleu. Le cluster de tyrosines (YC) est représenté en violet. Les motifs de Walker sont indiqués en jaune. D'après Grangeasse *et al.*, 2010

De par leur conservation au sein des génomes bactériens, la famille des BY-kinases est considérée comme étant responsable de la grande majorité des événements de phosphorylation sur la tyrosine retrouvés chez les bactéries. Cependant, d'autres tyrosine-kinases dites atypiques ont également été identifiées. On retrouve par exemple PtkA de *Mycobacterium tuberculosis* qui ne possède pas certaines des signatures caractéristiques des BY-kinases et des tyrosine-kinases de type eucaryote (Bach *et al.*, 2009), DivL chez *Caulobacter crescentus* ressemblant à une histidine-kinase mais capable de s'autophosphoryler sur un résidu tyrosyle ou encore McsB chez *B. subtilis* et *Bacillus anthracis* qui utilise un domaine guanidino-transférase lui permettant de phosphoryler des protéines sur des résidus tyrosyles ou arginyles (Furhmann *et al.*, 2009 ; Mattoo *et al.*, 2008) (Fig. 2).

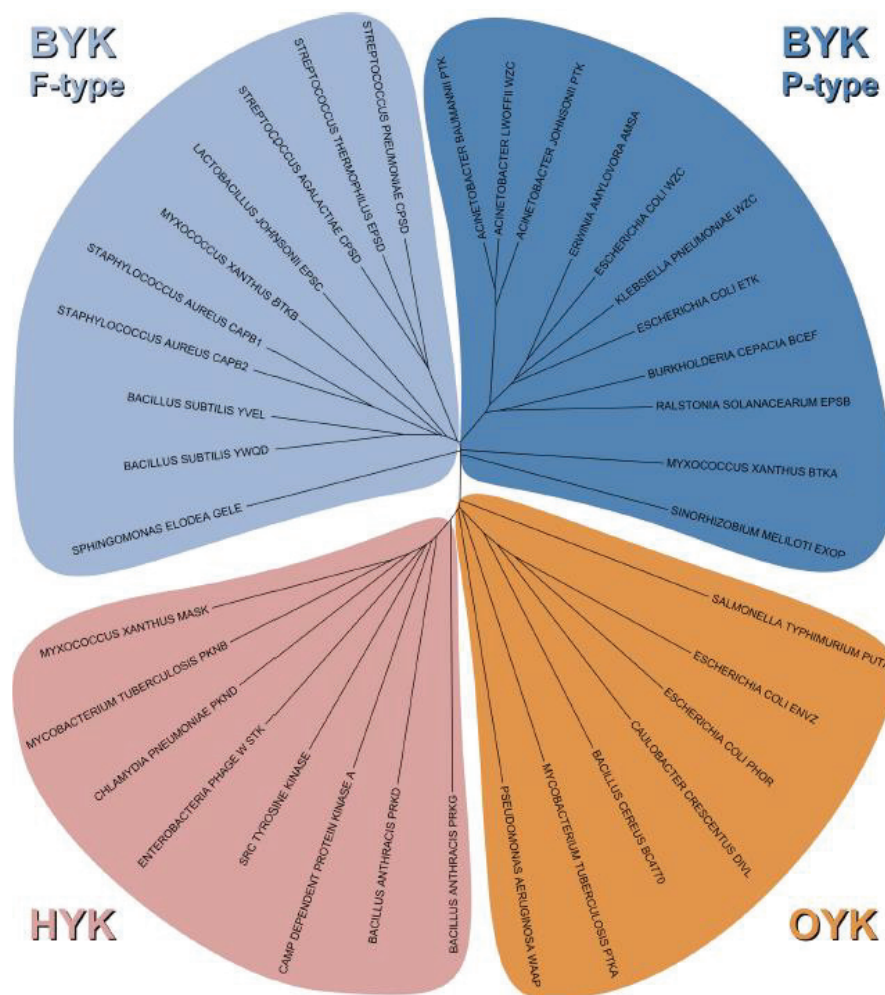


Figure 2 : Distribution phylogénétique des tyrosines-kinases identifiées chez les bactéries
 BYK : tyrosine-kinases bactériennes, HYK : tyrosine-kinases de type eucaryote, OYK : tyrosine-kinases atypiques,
 F-type : de type firmicute, P-type : de type protéobactérien. D'après Chao *et al.*, 2014

Les bactéries produisent également des phosphotyrosine-phosphatases pour réguler l'action des tyrosine-kinases bactériennes. Elles ont été identifiées grâce à leurs similarités de séquence et structurales avec leurs homologues eucaryotes. Ainsi, les différentes phosphatases identifiées chez les bactéries ont été classées au sein de deux familles : les phosphatases conventionnelles, parmi lesquelles on retrouve les PTPs (protéine tyrosine-phosphatases) et les DSPs (phosphatases à double spécificité), mais également les phosphatases de basse masse moléculaire (LMW-PTPs) (Kennely, 2002). Il est intéressant de noter que, chez les protéobactéries, les gènes codant pour les LMW-PTPs se situent juste en amont des gènes codant pour les BY-kinases alors qu'ils sont localisés ailleurs dans le génome chez les firmicutes. De fait, et à l'inverse de celles retrouvées chez les protéobactéries, il semblerait que les LMW-PTPs firmicutes ne soient pas capables de catalyser la déphosphorylation des BY-kinases (Mijakovic *et al.*, 2005a). Il a été démontré que la déphosphorylation de ces BY-kinases était réalisée par une nouvelle famille de phosphatases identifiée initialement chez *Streptococcus pneumoniae* (Morona *et al.*, 2002). Ces protéines possèdent des homologies structurales avec les polymérase à ADN et la famille des histidinol-phosphate phosphoestérases (PHP) et sont codées par des gènes situés juste en amont de ceux codant pour les BY-kinases. Ces phosphatases déphosphorylent les BY-kinases firmicutes et semblent jouer un rôle similaire à celui des LMW-PTPs chez les protéobactéries.

Il a été démontré que les BY-kinases sont capables de phosphoryler certaines protéines endogènes et, de ce fait, de participer à la régulation du métabolisme de l'ADN et à la résistance aux antibiotiques ainsi qu'à différents stress. Leur rôle dans la régulation de la biosynthèse et l'export des polysaccharides extracellulaires a notamment été particulièrement étudié.

Les polysaccharides extracellulaires bactériens sont composés d'une immense variété de sucres et de liaisons glycosidiques conduisant à une diversité de structure sans limite. Cette diversité est reflétée par le grand nombre de sérotypes différents identifiés pour une espèce donnée que ce soit pour les bactéries à Gram-positif comme pour celles à Gram-négatif. Chez de nombreuses bactéries, ils jouent un rôle critique dans les stratégies de survie et de protection des bactéries. C'est tout particulièrement le cas pour la bactérie *S. pneumoniae* (ou pneumocoque) chez laquelle il a été démontré que ces polysaccharides constituent le facteur de virulence le plus important grâce à son rôle anti-phagocytaire. En effet, une souche ne produisant pas ces composés n'est plus pathogène (Morona *et al.*, 2006). Le pneumocoque est une bactérie à Gram-

positif qui est responsable, chaque année, de la mort de plus d'un million et demi de personnes dans le monde. C'est un pathogène majeur pour l'homme provoquant de nombreuses maladies telles que des pneumonies, des méningites, des otites, ou encore des septicémies. Ces maladies conduisent à des taux élevés de mortalité surtout lorsqu'elles touchent des sujets jeunes, âgés ou immunodéprimés. Actuellement, le traitement des maladies induites par ce pathogène est entravé par l'émergence de nombreuses souches résistantes aux antibiotiques et par l'efficacité suboptimale des vaccins existants (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995). L'étude de ce pathogène et la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre les infections dont il est responsable constituent donc un enjeu de santé internationale.

Chez *S. pneumoniae*, une seule BY-kinase a été identifiée. Il s'agit de la BY-kinase cytoplasmique CpsD qui est indispensable à la synthèse de la capsule polysaccharidique (Morona *et al.*, 2004). Cependant, les mécanismes mis en place par CpsD dans le contrôle de la production du polysaccharide capsulaire demeurent largement méconnus.

L'un des axes de recherche important de l'équipe « Bactéries Pathogènes et Phosphorylation des Protéines » dans laquelle j'ai effectué ma thèse concerne notamment la caractérisation du rôle des protéine-kinases bactériennes dans la physiologie bactérienne. Mon travail de thèse a donc consisté à étudier le rôle des BY-kinases par différentes approches de biologie cellulaire, génétique et biochimie. J'ai tout particulièrement concentré mes efforts sur l'étude du rôle de l'autophosphorylation de CpsD, la BY-kinase du pathogène humain *S. pneumoniae*. Ces travaux n'étant pas encore publiés, une présentation exhaustive de mes résultats sera présentée. En parallèle, en collaboration avec le laboratoire de cristallographie du Pr. Nessler de l'Université Paris-Sud, j'ai étudié l'importance de certains résidus dans l'activation de l'autophosphorylation des BY-kinases de *Staphylococcus aureus*, CapB1 et CapB2, par leurs modulateurs transmembranaires, CapA1 et CapA2. Enfin, en collaboration avec le laboratoire new-yorkais de résonance magnétique nucléaire du Dr. Ghose, j'ai contribué à la caractérisation de la surface d'interaction entre le domaine cytoplasmique de Wzc, une BY-kinase d'*E. coli*, et sa phosphotyrosine-phosphatase associée Wzb. Ces deux travaux ayant fait l'objet d'une publication, leur présentation sera réalisée à partir de ces articles.

Pour introduire ce travail, je présente dans la première partie de l'exposé bibliographique, une description de la famille des BY-kinases ainsi que les connaissances actuelles concernant

leurs propriétés structurales et leurs rôles physiologiques. Je décris ensuite les données existantes concernant la synthèse et l'export des polysaccharides extracellulaires et plus particulièrement celles du polysaccharide capsulaire du pneumocoque. Enfin, je termine cet exposé bibliographique par une présentation de certains éléments du mécanisme de la division cellulaire des bactéries. En effet, mes observations concernant la BY-kinase CpsD m'ont amené à formuler une hypothèse inattendue concernant le rôle de CpsD dans la coordination de la synthèse de la capsule polysaccharidique et du cycle cellulaire du pneumocoque.

Exposé bibliographique

I Les tyrosine-kinases bactériennes

I.1 Découverte de la phosphorylation sur la tyrosine chez les bactéries

Les premières observations démontrant la présence de la phosphorylation sur la tyrosine chez les bactéries remontent à la fin des années 80. En effet, en 1986, l'équipe du Pr. Cozzzone a montré la présence de protéines phosphorylées sur des résidus tyrosyles au sein d'hydrolysats totaux d'*E. coli* (Cortay *et al.*, 1986). L'existence de tyrosine-kinases a ensuite été examinée chez de nombreuses bactéries. Ainsi, dans le milieu des années 90, la présence de phosphotyrosines était détectée chez 22 espèces bactériennes différentes (Cozzzone, 1997). Malgré la présence de ces résidus phosphorylés, l'existence de la phosphorylation des protéines sur les résidus tyrosyles est restée un sujet de controverse du fait de l'absence d'identification de tyrosine-kinases permettant de catalyser cette réaction au sein des différents organismes bactériens. De plus, aucune étude ne démontrait clairement l'implication de cette modification post-traductionnelle dans la régulation d'un processus biologique donné de la cellule bactérienne. La caractérisation biochimique et génétique d'une activité tyrosine-kinase chez les bactéries apparaissait donc comme une nécessité afin de poser les bases de l'étude du rôle de la phosphorylation des résidus tyrosyles au sein des organismes procaryotes.

I.2 La première tyrosine-kinase bactérienne : Ptk d'*Acinetobacter johnsonii*

A la fin des années 90, des études réalisées chez *A. johnsonii* ont permis de mettre en évidence une protéine de 82 kDa phosphorylée sur la tyrosine aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Lors de cette étude, il a été démontré que cette protéine était capable de s'autophosphoryler *in vitro* et pouvait donc être qualifiée de tyrosine-autokinase (Duclos *et al.*, 1996). Cette protéine, appelée Ptk pour « Prokaryotic Tyrosine-Kinase » constitue le premier exemple de protéine tyrosine-kinase bactérienne. Une étude biochimique de cette protéine ainsi que la caractérisation du gène *ptk* a été réalisée l'année suivante (Grangeasse *et al.*, 1997).

Cette protéine, localisée dans la membrane interne de la cellule bactérienne et incapable de phosphoryler des substrats classiques de tyrosine-kinases eucaryotes, est capable de s'autophosphoryler sur au moins 5 résidus tyrosyles aux dépens de l'ATP. De plus, l'activité tyrosine-autokinase de cette protéine est insensible à la génistéine ainsi qu'à la quercétine, deux

inhibiteurs reconnus des tyrosine-kinases eucaryotes. Ces données suggéraient déjà que cette tyrosine-kinase bactérienne présentait des caractéristiques différentes de celles retrouvées chez les eucaryotes.

Par la suite, l'analyse de la séquence en acide-aminés de Ptk a révélé la présence de deux séquences particulières généralement retrouvées chez les protéines fixant les nucléotides :

- La séquence G⁵⁴²PAPEVGKS⁵⁵⁰ ressemblant à un motif A de Walker, aussi appelé P-loop, dont la séquence consensus est [G/A]-X(4)-G-K-[S/T]. La lysine conservée au sein de ce motif permet aux protéines à P-loop d'interagir avec les phosphates β et γ du nucléotide tandis que la sérine ou la thréonine interagit avec un cation divalent (Mg^{2+}).
- La séquence V⁶⁴⁸IID⁶⁵¹, similaire à un motif B de Walker (h-h-h-D, h correspond à un résidu hydrophobe), joue un rôle dans la liaison avec le cation divalent (Mg^{2+}) par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. Cette interaction est essentielle à l'hydrolyse du nucléotide.

Différentes expériences ont ensuite permis de démontrer que ces deux motifs constituent le site catalytique de Ptk (Doublet *et al.*, 1999) et que les résidus lysyle 549, séryle 550 et aspartyle 651 sont indispensables à la fixation de l'ATP et à la réaction de phosphotransfert. La protéine Ptk possède donc un mécanisme atypique d'autophosphorylation nécessitant les motifs A et B de Walker.

I.3 Une nouvelle famille de protéines : les BY-kinases

Suite à la découverte de Ptk, de nombreux gènes homologues à *ptk* et codant pour des tyrosine-kinases bactériennes potentielles ont été identifiés chez différentes bactéries grâce à l'analyse des génomes accessibles. Il a également été observé qu'aucun homologue de *ptk* n'était présent chez les cellules eucaryotes. Ces différentes protéines ont alors été regroupées au sein d'une nouvelle famille de protéines : la famille des « *Bacterial tyrosine-kinases* » ou BY-kinases (Grangeasse *et al.*, 2007). A ce jour, il semble que cette famille de protéine-kinases soit majoritairement responsable des réactions de phosphorylation au niveau de la tyrosine des protéines bactériennes.

Les BY-kinases sont des protéines transmembranaires capables de s'autophosphoryler sur plusieurs résidus tyrosyles aux dépens de l'ATP. Elles sont constituées d'un domaine extracellulaire relié par deux hélices transmembranaires à un domaine cytoplasmique contenant le site catalytique (**Fig. 1**). Selon leur origine phylogénétique, ces deux domaines sont soit retrouvés au sein d'une même protéine (protéobactéries et actinobactéries), soit codés par deux gènes distincts (firmicutes) traduits en une protéine transmembranaire et une seconde cytoplasmique. Ces deux protéines sont capables d'interagir afin de reconstituer une protéine comparable à celle trouvée chez les protéobactéries (Grangeasse *et al.*, 2007) (**Fig. 3**). L'interaction entre ces deux protéines est nécessaire à l'activité tyrosine-kinase des BY-kinases chez les firmicutes (Mijakovic *et al.*, 2003 ; Soulat *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que l'interaction entre le peptide cytoplasmique en C-terminal de la protéine transmembranaire et la protéine cytoplasmique était suffisante pour déclencher l'activité kinase (Soulat *et al.*, 2006). Chez les firmicutes, il a cependant été proposé que le domaine catalytique cytoplasmique puisse interagir avec d'autres protéines capables de moduler sa fonction (Mijakovic *et al.*, 2005).

Peu de données concernant le domaine extracellulaire des BY-kinases ont été décrites dans la littérature. Il a été observé que cette boucle extracellulaire était plus petite chez les firmicutes par rapport à celle retrouvée chez les protéobactéries (Grangeasse *et al.*, 2007) et que la présence d'une séquence riche en proline, précédant le deuxième passage transmembranaire, semble être importante pour la synthèse de polysaccharides extracellulaires (Becker et Puhler, 1998 ; Morona *et al.*, 2000b ; Obadia *et al.*, 2007) (**Fig. 3**). De plus, ce domaine extracellulaire présenterait une similarité de structure secondaire avec certaines protéines membranaires telles que les protéines Wzz impliquées dans la synthèse des lipopolysaccharides (Morona *et al.*, 2009).

A l'inverse, le domaine cytoplasmique, contenant les motifs de Walker et portant l'activité catalytique, a fait l'objet de plusieurs études (**Fig. 3**). La séquence des motifs de Walker (A, A' et B) des BY-kinases présente quelques variations par rapport aux séquences canoniques décrites chez les autres protéines fixant les nucléotides (Jadeau *et al.*, 2008). Seuls trois acides aminés (G-K-[S/T]) sont strictement conservés dans le motif de Walker A ([G/A]-X(4)-G-K-[S/T]) alors que le motif de Walker B (h-h-h-D) est étendu à [ILVFM](3)-D-X(2)-P. Le motif de Walker A' ([ILVFM](3)-D-X-D-X-R) est, quant à lui, un motif additionnel situé entre les motifs A et B de Walker, et retrouvé uniquement dans la sous-famille SIMIBI (superfamille des MinD et BioD) des GTPases (Leipe *et al.*, 2002).

La présence d'une séquence riche en tyrosines (*tyrosine-cluster*, YC), en position C-terminale du domaine cytoplasmique, a également été décrite (**Fig. 3**). Les tyrosines présentes dans ce motif sont toutes phosphorylées par un mécanisme intermoléculaire (transphosphorylation). De plus, chez les protéobactéries, il a été montré qu'une tyrosine, située quelques résidus en aval du motif A' de Walker, est la cible d'une réaction d'autophosphorylation intramoléculaire (cis-phosphorylation) qui stimulerait la phosphorylation du YC (Grangeasse *et al.*, 2002) (**Fig. 3**). Cependant, cette tyrosine n'est pas systématiquement retrouvée dans la séquence des BY-kinases et sa phosphorylation ne serait pas indispensable à celle du YC de certaines BY-kinases (Wugeditsch *et al.*, 2001).

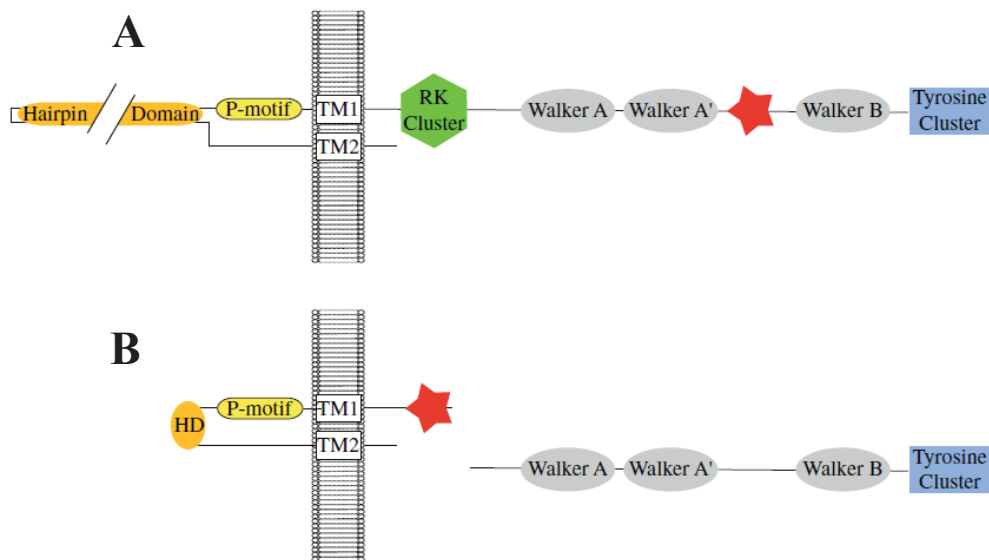


Figure 3 : Organisation des BY-kinases chez les protéobactéries (A) et les firmicutes (B)

Les étoiles rouges correspondent au site interne de phosphorylation (A) ou aux résidus hydrophobes qui complètent le site de fixation de l'ATP respectivement retrouvés chez les protéobactéries et les firmicutes. TM1 et TM2 : domaine transmembranaire 1 et 2, RK cluster : séquence riche en arginine et en lysine, tyrosine cluster : séquence riche en tyrosine, P-motif : séquence riche en proline, HD : boucle extracellulaire en forme d'épingle à cheveux.

D'après Béchet *et al.*, 2009

Pour résumer, la signature caractéristique de la famille des BY-kinases est constituée d'un motif A de Walker G-K-[S/T], un motif A' de Walker [ILVFM](3)-D-X-D-X-R, un motif B de Walker [ILVFM](3)-D-X(2)-P et un cluster de tyrosines. Sur la base de ces données, une banque de donnée dédiée à l'analyse des BY-kinases a été développée et est maintenant accessible sous le nom de BYKdb (<https://bykdb.ibcp.fr/BYKdb/> ; Jadeau *et al.*, 2012 ; Shi *et al.*, 2014).

I.4 Etudes structurales des BY-kinases

I.4.i Chez les firmicutes

La première analyse structurale d'une BY-kinase de firmicute, CapB2 de *S. aureus*, fusionnée au peptide activateur de la protéine membranaire CapA1, a montré que l'activation de CapB2 est due à la présence d'un résidu hydrophobe de l'extrémité C-terminale de CapA1 (phénylalanine 221) (Olivares-Illana *et al.*, 2008) (**Fig. 3 et 4A**). Ce résidu stabilise la molécule d'ATP dans sa poche de fixation en interagissant avec le plateau de l'adénine augmentant ainsi l'affinité de CapB2 pour l'ATP. Ce résidu hydrophobe est très conservé chez les BY-kinases des firmicutes et des protéobactéries. Cependant, chez ces dernières, le résidu stabilisant l'interaction avec l'ATP est placé immédiatement après le motif A de Walker (**Fig. 7B**).

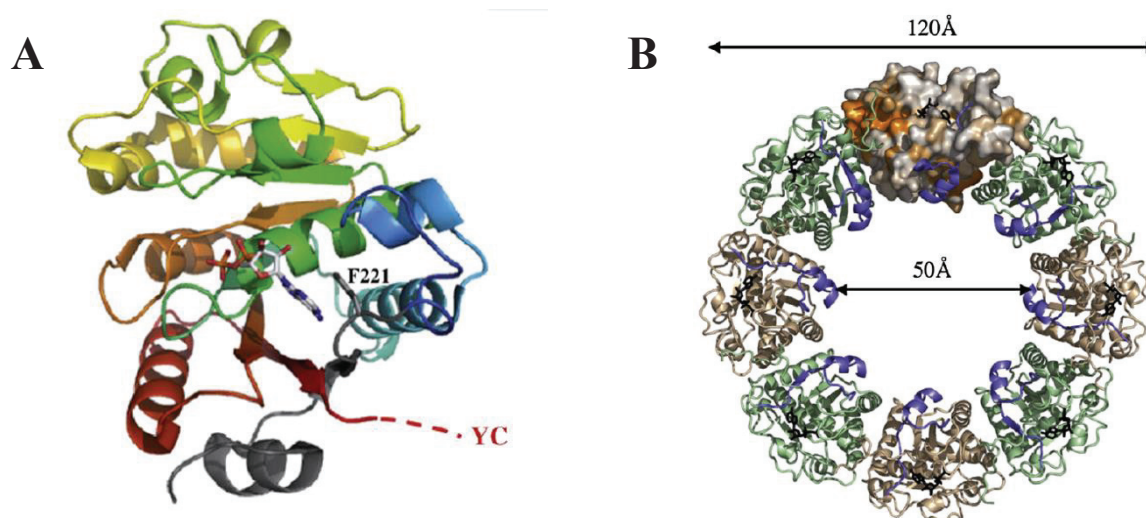


Figure 4 : Structure de la forme monomérique phosphorylée du complexe CapA1_{cyto}B2/ADP (3BFV) (A) et de l'octamère non-phosphorylé de CapA1_{cyto}B2/ADP (B)

(A) Le domaine kinase CapB2 est coloré en spectre tandis que le peptide activateur de CapA1 est coloré en gris. Le résidu F221 interagissant avec la base nucléotidique est représenté en bâton. La structure désorganisée du YC figure en pointillés. (B) Une des sous-unités est colorée en surface selon le taux de conservation des résidus la composant.

Les résidus les plus conservés (orange) se situent au niveau de la surface d'interaction entre deux sous-unités.

D'après Grangeasse *et al.*, 2010

Il a été montré que la structure cristallographique de la protéine CapA1_{cyto}B2, mutée sur la lysine catalytique du motif A de Walker, et donc incapable de s'autophosphoryler, forme un octamère en forme d'anneau (**Fig. 4B**). Dans cet octamère, le domaine YC apparaît comme une longue boucle flexible à l'interface entre deux monomères, la dernière tyrosine plongeant dans le

site actif de la sous-unité voisine (**Fig. 5**). Cette observation fournit une explication structurale au mécanisme d'inter-phosphorylation du domaine YC précédemment observé (Grangeasse *et al.*, 2002). Sachant que la forme native de la protéine CapA1_{cyto}B2 autophosphorylée est monomérique, il a alors été proposé que la phosphorylation soit nécessaire à la dissociation de la structure octamérique en anneau (Olivares-Illana *et al.*, 2008). Ces observations suggèrent que la forme monomérique phosphorylée, présentant un site catalytique accessible, serait responsable de la phosphorylation de substrats endogènes (Mijakovic *et al.*, 2005).

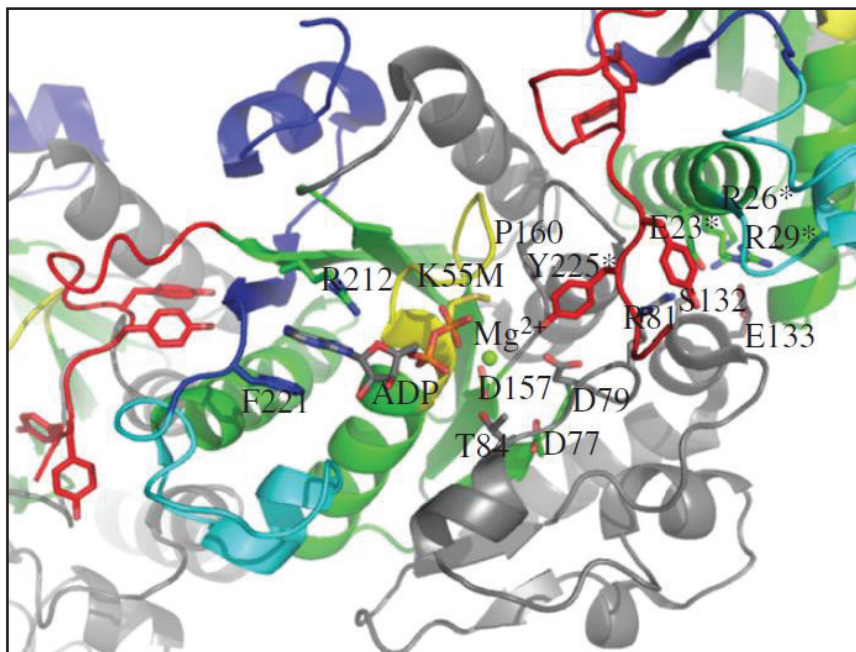


Figure 5 : Vue du site catalytique de la chimère CapA1_{cyto}B2

La molécule d'ADP-Mg²⁺ liée est représentée en bâton au niveau du motif de Walker A (en jaune) possédant la mutation catalytique K55M. Le résidu tyrosyle phosphorylable Y225 du cluster de tyrosine de la protéine voisine est indiqué. Les résidus D157 et P160 appartenant au motif de Walker B et D77, D79 et R81 appartenant au motif de Walker A' sont également indiqués. Le résidu R81 ainsi que les résidus S132 et E133 participent à formation de l'octamère par contact avec les résidus E23, R26 et R29 (motif EX₂RX₂R) de la sous-unité voisine. D'après Grangeasse *et al.*, 2012

La présence d'une deuxième surface de contact entre deux monomères a également été mise en évidence. Il s'agit du motif EX₂RX₂R présent sur l'hélice α 2 de CapB2. Ce motif est très conservé chez les BY-kinases (Jadeau *et al.*, 2008) et est nécessaire à l'autophosphorylation intermoléculaire de CapB2 (Olivares-Illana *et al.*, 2008) (**Fig. 5**).

I.4.ii Chez les protéobactéries

Les premières informations structurales concernant les BY-kinases protéobactériennes ont été obtenues par cryomicroscopie électronique en utilisant la protéine Wzc d'*E. coli* comme modèle. Il a été proposé que les BY-kinases puissent former des tétramères qui constitueraient un complexe avec la translocase du polysaccharide capsulaire Wza (Collins *et al.*, 2007) (**Fig. 6**). L'interaction s'effectuerait *via* les domaines extracellulaires des BY-kinases sans que les domaines kinases cytoplasmiques ne soient en contact les uns avec les autres dans le cytosol.

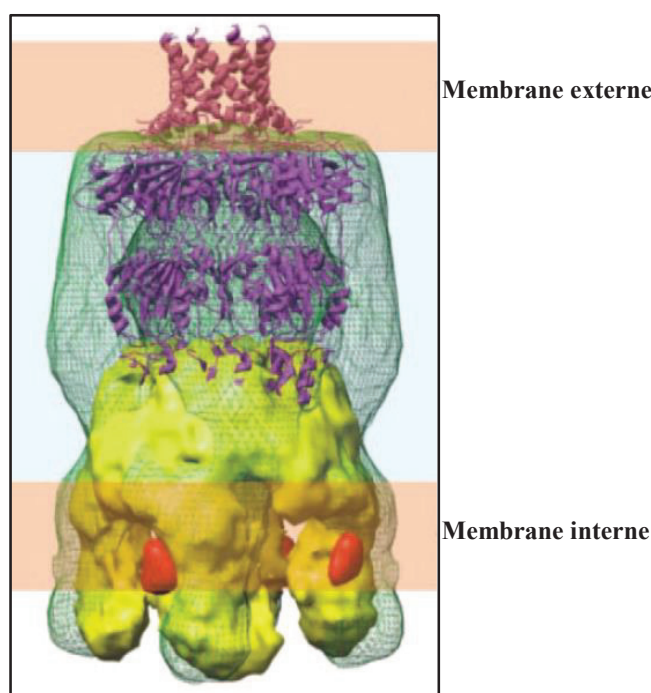


Figure 6 : Proposition d'organisation du complexe Wza/Wzc

Modèle réalisé à partir de la structure de Wzc obtenue par cryomicroscopie électronique, en jaune, et la structure cristallographique en ruban de Wza, en violet et rose. L'emplacement occupé par le tag six histidines est représenté en rouge. D'après Cuthbertson *et al.*, 2009

L'analyse de la structure cristallographique du domaine catalytique de la BY-kinase Etk d'*E. coli*, a permis de formuler certaines hypothèses concernant l'organisation et le mécanisme catalytique des BY-kinases chez les protéobactéries (Lee *et al.*, 2008). Il a été proposé que la cis-phosphorylation de la tyrosine proche du motif A' de Walker libèrerait le site catalytique afin de le rendre accessible au cluster de tyrosines YC et à l'ATP pour la transphosphorylation des tyrosines (Lee *et al.*, 2008 ; Lu *et al.*, 2009) (**Fig. 7A et 7B**). Cette forme, alors active, serait stabilisée par une interaction entre la chaîne latérale de cette tyrosine phosphorylée et un résidu

arginyle (R614 dans Etk). Un autre résidu arginyle a été détecté dans la zone du site actif (R572 dans Etk). Ce dernier aurait également un effet sur la rotation de la chaîne latérale de la tyrosine mais conduirait, lui, à un ralentissement de l'ouverture du site régulant ainsi l'activité kinase de Etk. Ces observations réalisées essentiellement *in silico* demandent néanmoins à être confirmée par des approches biochimiques.

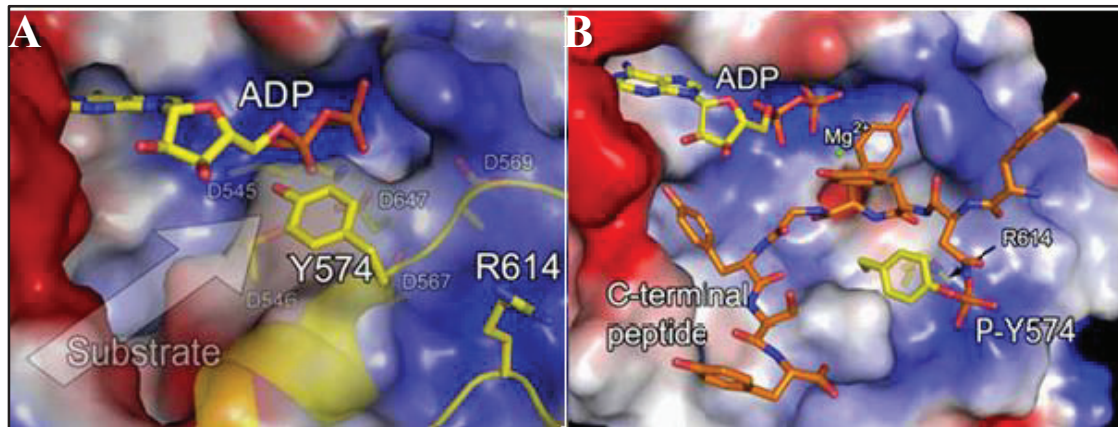


Figure 7 : (A) Activation de la BY-kinase Etk

(A) La tyrosine 574 déphosphorylée bloquerait l'accès du substrat au site actif. (B) La chaîne latérale de la Y574 phosphorylée interagirait avec celle de l'arginine 614 et permettrait à l'ATP et au YC d'accéder au site actif. D'après Lee *et al.*, 2008

L'analyse du domaine cytoplasmique de Etk a également permis de mettre en évidence un nouveau motif, riche en arginine et en lysine, appelé domaine RK (Lee *et al.*, 2008) (**Fig. 3**). Ce motif, conservé dans les BY-kinases des protéobactéries, correspondrait à la jonction entre les deux protéines composant les BY-kinases chez les firmicutes. Il a été proposé que le domaine RK interagisse avec les domaines YC et stabilise la formation du tétramère observé par cryomicroscopie électronique (Collins *et al.*, 2006) (**Fig. 8A**). Néanmoins, ce rôle attribué aux domaines RK et YC reste à l'état d'hypothèse car ces deux domaines sont extrêmement flexibles et la faible densité électronique qui leur est associée ne permet pas de les positionner avec précision (**Fig. 8B**).

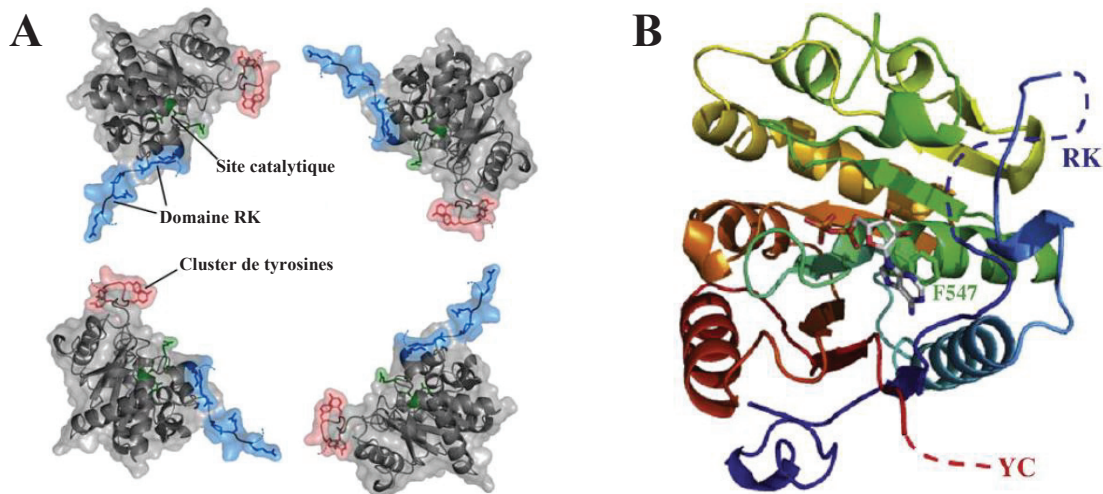


Figure 8 : Modèle représentant la stabilisation du tétramère d'Etk par les interactions entre les domaines RK et YC (A) et structure monomérique du domaine cytoplasmique d'Etk (3CIO) (B)
 (A) D'après Lee *et al.*, 2008. (B) Une molécule d'ATP est représentée en bâton dans la poche catalytique mettant en avant l'interaction entre la F547 et la base adénine. Le YC et le RK cluster, étant non structurés, sont représentés en pointillé. D'après Grangeasse *et al.*, 2010

Récemment, la structure cristallographique du domaine cytoplasmique d'une troisième BY-kinase, Wzc, a été obtenue (Béchet *et al.*, 2010). Comme pour CapB2, les auteurs ont utilisé une forme inactivée de la protéine en mutant la lysine catalytique du motif A de Walker. Il a été observé que Wzc forme un octamère de dimensions identiques à celles obtenues pour CapB2 (**Fig. 9A**), les domaines YC et EX₂RX₂R étant de nouveau retrouvés à l'interface entre deux monomères (**Fig. 9B**).

Cette structure octamérique ne corrobore pas les observations réalisées en cryomicroscopie électronique qui ne sont que faiblement résolutes (Collins *et al.*, 2006) (**Fig. 6**). La détermination de la structure de la protéine complète semble nécessaire pour fixer définitivement le niveau d'oligomérisation de cette protéine. Il a néanmoins été démontré que des souches d'*E. coli* exprimant la protéine Wzc mutée sur la signature EX₂RX₂R, sont fortement affectées dans leur capacité à produire de l'acide colanique, l'exopolysaccharide synthétisé et exporté par cette bactérie. Le domaine EX₂RX₂R étant à la fois nécessaire à la stabilité de l'octamère et à l'activité kinase de Wzc, ces observations accréditent une organisation octamérique dans la voie de biosynthèse des polysaccharides extracellulaires.

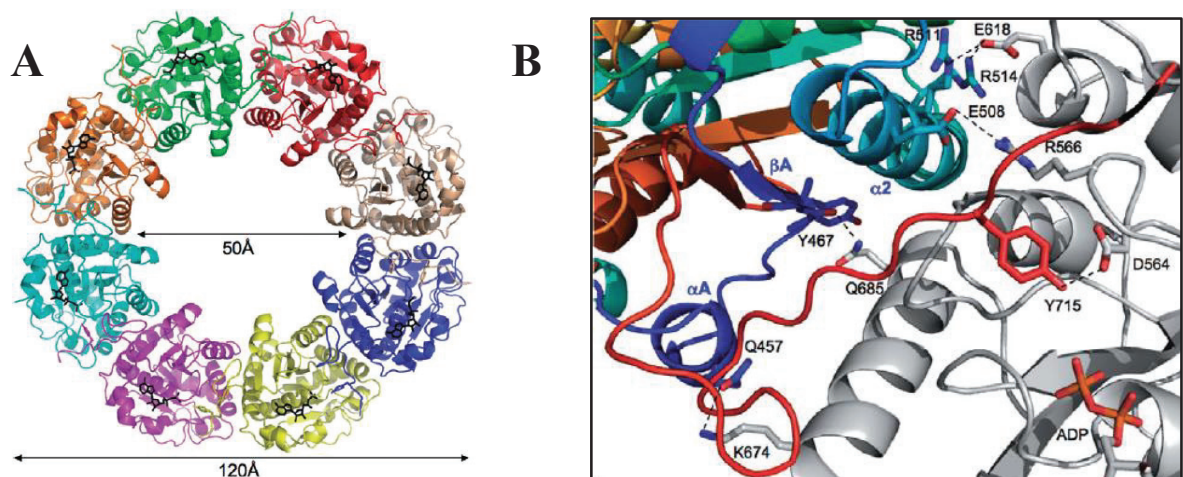


Figure 9 : Structure cristallographique de l'octamère formé par la forme non-phosphorylée de la partie cytoplasmique de Wzc (A) et grossissement de la zone d'interaction entre deux sous-unités voisines (B)
 (A) Chaque sous-unité est de couleur différente. Les molécules d'ADP fixées sont représentées en noir. (B) Une sous-unité est colorée en spectre tandis que la sous-unité voisine est colorée en gris. Les chaînes latérales des résidus évoluant dans les interactions spécifiques sont représentés en bâton. Les liaisons hydrogènes figurent en pointillé.
 D'après Béchet *et al.*, 2010

En ce qui concerne le mécanisme d'autophosphorylation en deux étapes (cis- et transphosphorylation), l'analyse de la structure du domaine cytoplasmique de Wzc montre que la tyrosine proche du motif A' de Walker interagit avec le phosphate α de l'ATP (Béchet *et al.*, 2010) (**Fig. 10**). Cependant, les positions relatives de la tyrosine 569 et de l'ATP ne sont pas compatibles avec le transfert en ligne d'un groupement phosphate (Hartmann *et al.*, 2006). Il a été imaginé que, pour permettre la phosphorylation de cette tyrosine, l'ATP pourrait se placer différemment dans la poche de fixation. Cependant cette hypothèse semble peu réaliste vis-à-vis des fortes contraintes qui seraient introduites au niveau de la poche de fixation (Smith et Rayment, 1996). L'importante diminution de la transphosphorylation observée lors de la mutation de cette tyrosine (Grangeasse *et al.*, 2002) pourrait trouver son origine dans le fait que l'interaction entre cette dernière et le phosphate α de l'ATP est cruciale pour la fixation du nucléotide au site actif et donc pour la phosphorylation du YC (Béchet *et al.*, 2010). De plus, la mutation de cette tyrosine en alanine, mimant un site actif accessible, génère une forte diminution de l'activité kinase de Wzc, de son affinité pour l'ATP ainsi que de la capacité d'*E. coli* à produire de l'acide colanique. L'hypothèse selon laquelle le site actif est rendu accessible par pivotement de la chaîne latérale de la tyrosine suite à sa phosphorylation n'est donc pas vérifiée (Lee *et al.*, 2008 ; Béchet *et al.*, 2010). Ainsi, cette tyrosine s'avère être essentielle à la liaison du nucléotide au site actif de l'enzyme et à l'activité kinase. La phosphorylation de la tyrosine

proche du motif A' de Walker (Grangeasse *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2008) pourrait alors être due aux conditions expérimentales et à un manque de spécificité des BY-kinases.

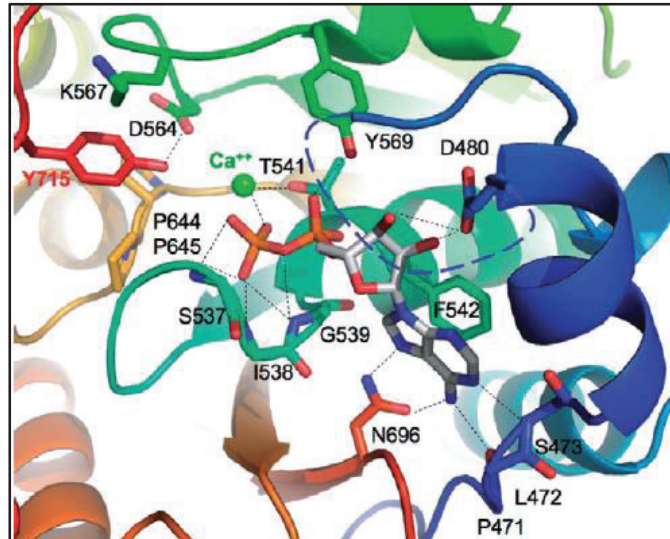


Figure 10 : Représentation des différentes interactions entre l'ADP et les résidus du site actif de Wzc_{cyto}

La protéine est visualisée par coloration en spectre. La molécule d'ADP représentée en bâton et colorée selon la nature des atomes. Les résidus intervenant dans cette interaction sont également représentés en bâton. Les liaisons hydrogènes figurant en pointillé noir. La région non structurée correspondant au RK-cluster est représentée en pointillé bleu. La tyrosine phosphorylable Y715 de la protéine voisine est colorée en rouge et arrive à proximité de la molécule d'ADP au travers d'une porte formée par les chaînes latérales des résidus P644 et P645 du motif de Walker B et de K567. D'après Béchet *et al.*, 2010

Comme pour Etk, la structure du domaine cytoplasmique de Wzc ne permet pas d'obtenir des informations concernant l'organisation du domaine RK. Cependant, par modélisation et dynamique moléculaire, il a été proposé que ce domaine puisse réguler l'activité de Wzc. Une étude portant sur le rôle du domaine RK dans la fixation ou l'hydrolyse de l'ATP montre que certains résidus de ce domaine sont indispensables à l'activité kinase de Wzc (Béchet *et al.*, 2010). Il a également été démontré que ce domaine est nécessaire à la production de l'acide colanique indépendamment de son rôle dans l'activité kinase. Par conséquent, si cette région flexible peut être considérée comme un domaine régulateur de l'activité tyrosine-kinase de Wzc, et plus généralement des BY-kinases des protéobactéries, elle est vraisemblablement impliquée dans des interactions avec d'autres protéines, comme celles retrouvées dans la machinerie de transport des polysaccharides. L'activation de Wzc pourrait ainsi être contrôlée par le domaine RK en fonction de son interaction avec d'autres protéines.

1.5 Rôles cellulaires des BY-kinases

1.5.i La synthèse et l'export des polysaccharides extracellulaires

Les travaux réalisés ces dix dernières années ont démontré que les BY-kinases interviennent dans la régulation de différents processus cellulaires dont le contrôle de la production des polysaccharides extracellulaires. Les études portant sur cette production ont été réalisées chez *E. coli* mais également d'autres bactéries telles que *Sinorhizobium meliloti*, *Acinetobacter lwoffii*, *S. pneumoniae* et *Klebsiella pneumoniae* (Niemeyer et Becker, 2001 ; Nakar et Gutnick, 2003 ; Morona *et al.*, 2004 ; Lin *et al.*, 2009). Chez ces bactéries, les gènes codant pour les BY-kinases se situent au sein de larges opérons dirigeant la synthèse des polymères polysaccharidiques (Whitfield, 2006). Chez *E. coli*, deux BY-kinases ont été identifiées, Wzc et Etk. Etk est nécessaire à la formation de la capsule de groupe 4 (Peleg *et al.*, 2005) alors que Wzc est impliquée, selon le sérotype, soit dans la synthèse de l'acide colanique (Vincent *et al.*, 2000), soit dans la synthèse de la capsule de groupe 1 (Wugeditsch *et al.*, 2001). Il a été démontré que l'autophosphorylation des BY-kinases et, plus précisément, celle de Wzc et d'Etk au niveau du cluster de tyrosine, contrôle la capacité d'une bactérie à produire un polysaccharide extracellulaire.

Les BY-kinases sont présentes dans le complexe d'assemblage qui permet aux polysaccharides de franchir la membrane, ou les deux membranes interne et externe chez les protéobactéries. Il a été démontré que le domaine périplasmique de Wzc interagit avec la protéine de la membrane externe Wza (**Fig. 6**). Ces deux protéines forment un échafaudage traversant les deux membranes cellulaires et permettant le recrutement des protéines du complexe d'assemblage contrôlant l'export des polymères polysaccharidiques (Reid et Whitfield, 2005). En outre, il a été proposé que Wzc joue un rôle de co-polymérase dans la production de polymères de haute masse moléculaire (Whitfield et Paiment, 2003). Même si la fonction précise des BY-kinases reste relativement méconnue, il est clair que leur autophosphorylation affecte le fonctionnement du complexe d'assemblage et d'export des polysaccharides. En effet, il a été démontré que les formes phosphorylée et non-phosphorylée de Wzc sont alternativement nécessaires pour l'export du polymère polysaccharidique (Obadia *et al.*, 2007). Les cycles de phosphorylation/déphosphorylation de Wzc en particulier et des BY-kinases en général seraient régulés par la phosphotyrosine-phosphatase Wzb codée par un gène présent dans les opérons

contrôlant la biosynthèse des polysaccharides extracellulaires (Obadia *et al.*, 2007). Le fonctionnement ainsi que la description de ce complexe de biosynthèse et d'export des polysaccharides extracellulaires seront détaillés plus loin dans cet exposé.

Les BY-kinases n'affectent pas seulement l'export des polysaccharides. Elles contrôlent également leur synthèse en phosphorylant des enzymes impliquées dans la production des sucres simples précurseurs. Par exemple, chez *E. coli*, Wzc et Etk sont capables de phosphoryler la protéine Ugd, une UDP-glucose déshydrogénase nécessaire à la synthèse d'UDP-acide glucuronique (Grangeasse *et al.*, 2003). Lorsqu'Ugd est phosphorylée, son activité déshydrogénase est augmentée. De plus, sa phosphorylation par Wzc permettrait de réguler la quantité produite de polysaccharides alors que sa phosphorylation par Etk, sur le même résidu tyrosyle, conduirait à la synthèse d'un sucre modifié intervenant dans les processus de résistance aux agents antimicrobiens tels que la polymyxine et les peptides cationiques (Lacour *et al.*, 2008). La phosphorylation d'enzymes portant une activité sucre-déshydrogénase a également été observée chez d'autres bactéries telles que *B. subtilis* et *S. aureus* (Mijakovic *et al.*, 2003 ; Soulat *et al.*, 2007 ; Gruszczuk *et al.*, 2011). Cependant les mécanismes moléculaires conduisant à l'activation de ces sucre-déshydrogénases par les BY-kinases ne sont pas clairement établis. En effet, il a récemment été montré que l'activité d'Ugd chez *E. coli* serait contrôlée de manière allostérique par les nucléotides triphosphates (Mainprize *et al.*, 2013)

Par ailleurs, une étude effectuée chez *Streptococcus thermophilus* montre que la forme phosphorylée de la kinase EpsD est nécessaire à l'activité de la phosphogalactosyl-transférase EpsE intervenant dans la synthèse des polysaccharides extracellulaires (Minic *et al.*, 2007). Les mécanismes précis de ce contrôle restent néanmoins à déterminer.

Le rôle particulier de l'autophosphorylation des BY-kinases dans la synthèse et l'export des polysaccharides extracellulaires seront détaillées dans la seconde partie de cet exposé bibliographique et ce notamment par une description exhaustive de l'état des connaissances au sujet du rôle de la BY-kinase CpsD dans la synthèse de la capsule polysaccharidique du pneumocoque.

I.5.ii Autres processus régulés par les BY-kinases

La caractérisation d'autres substrats des BY-kinases a permis de mettre en évidence que le rôle des BY-kinases n'était pas restreint au contrôle de la biosynthèse et de l'export des polysaccharides extracellulaires. Pour illustrer ceci, j'indique ci-après quelques exemples pour lesquels le rôle des BY-kinases a été clairement établi.

Les premiers substrats endogènes des BY-kinases ont été identifiés en 2003 chez *E. coli*. Il s'agit des facteurs sigma RpoH et anti-sigma RseA qui participent à la réponse au choc thermique (Klein *et al.*, 2003). Il a été montré *in vitro* et *in vivo* qu'Etk chez *E. coli* est capable de phosphoryler RpoH sur la tyrosine 260 permettant à la bactérie de mieux résister aux stress thermiques. En effet, cette phosphorylation induit une diminution conséquente de la capacité de RpoH à initier la transcription de gènes cibles. De plus, l'expression d'une protéine non-phosphorylable (Y260A) confère, à la bactérie, un phénotype thermosensible et conduit à une réponse aux chocs thermiques altérée. Parallèlement, la phosphorylation de RseA, l'anti-sigma du facteur sigma RpoE, sur le résidu tyrosyle 38 semble altérer sa fixation sur ce dernier, facilitant ainsi la capacité d'adaptation d'*E. coli* à un stress thermique.

Lors de la caractérisation de la phosphorylation de la protéine Ugd (cf. § I.5.i), il a été démontré que sa phosphorylation par Etk accroissait la capacité de résistance d'*E. coli* à des peptides cationiques antimicrobiens de type polymyxine (Lacour *et al.*, 2008). En effet, Ugd est également indispensable à la synthèse d'un sucre particulier, l'UDP-4-amino-4-désoxy-L-arabinose, qui, lorsqu'il est exporté, se fixe aux charges négatives présentes à la surface de la cellule bactérienne empêchant ainsi l'action des peptides cationiques. La stimulation de l'activité déshydrogénase de Ugd par phosphorylation permet de réguler la synthèse de ces sucres modifiés et favorise ainsi la résistance d'*E. coli* à la polymyxine.

Il a également été démontré que les BY-kinases pouvaient intervenir dans différents processus vitaux de la bactérie telle que le métabolisme de l'ADN ou encore la formation de biofilms. En effet, il a été montré que la BY-kinase PtkA de *B. subtilis* était capable de phosphoryler la protéine Ssb qui est une protéine de liaison à l'ADN simple brin (Mijakovic *et al.*, 2006). La phosphorylation de cette protéine permettrait ainsi d'augmenter considérablement sa capacité à lier l'ADN. D'ailleurs, chez des mutants n'exprimant plus PtkA, de l'ADN extra-

chromosomique s'accumule et la réplication de l'ADN est désorganisée (Petranovic *et al.*, 2007). A l'inverse, il a récemment été montré que la phosphorylation de la protéine FatR, un régulateur transcriptionnel, empêchait son interaction avec l'ADN conduisant ainsi à une absence de répression d'un gène codant pour une mono-oxygénase à acides gras (Derouiche *et al.*, 2013).

Toujours chez *B. subtilis*, l'équipe de Stanley-Wall a montré le rôle de la phosphorylation sur les tyrosines par les BY-kinases dans la formation des biofilms (Kiley et Stanley-Wall, 2010). La formation d'un biofilm par cet organisme se manifeste par l'élaboration d'une pellicule structurée à l'interface air/eau ou par la croissance d'une colonie architecturalement complexe sur milieu gélosé (Branda *et al.*, 2001). Les souches $\Delta ptkA$ sont incapables de former la structure radiale caractéristique des biofilms matures de *B. subtilis* sur un milieu gélosé semi-solide (**Fig. 11A et 11B**). La structure tridimensionnelle de la pellicule formée à l'interface air/eau en absence de PtkA (**Fig. 11D**) est, en revanche, plus complexe que celle observée chez la souche sauvage d'aspect granuleux (**Fig. 11E**). L'intégration du gène *ptkA* dans la souche $\Delta ptkA$ conduit à la restauration des propriétés de la souche sauvage (**Fig. 11C**). Ces observations traduisent donc une relation de cause à effet entre l'expression de PtkA et la production des biofilms.

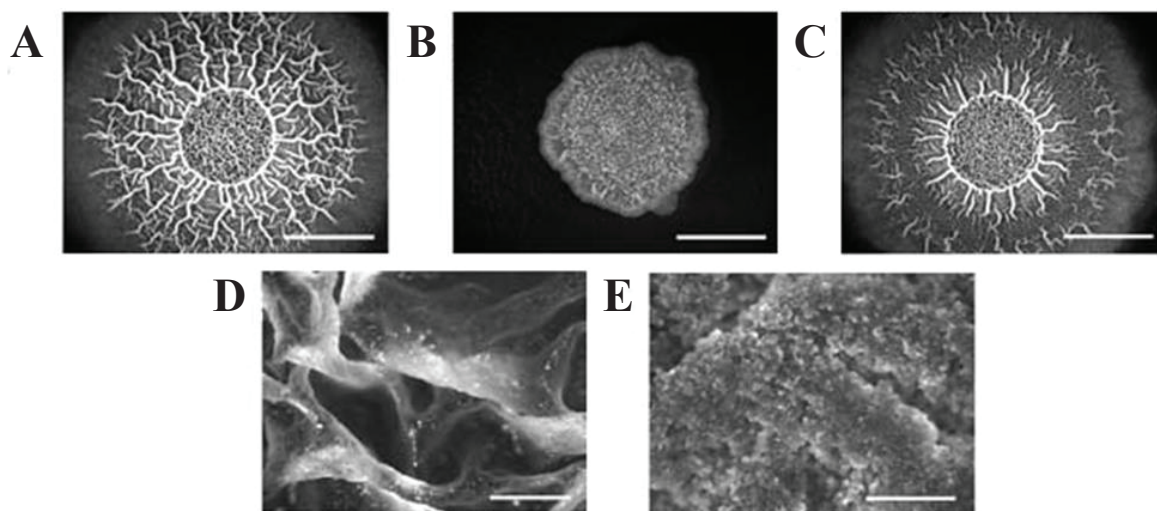


Figure 11 : Visualisation de l'architecture complexe et de la structure tridimensionnelle des colonies de *B. subtilis*

Architecture complexe des souches sauvages (A) et $\Delta ptkA$ (B) Récupération de cette architecture après induction du gène *ptkA-lacI* dans la souche $\Delta ptkA$ (C). Structure tridimensionnelle formée à l'interface air/eau par les souches $\Delta ptkA$ (D) et sauvages (E). D'après Kiley et Stanley-Wall, 2010

Il a aussi été observé que les BY-kinases ne seraient pas seulement capable de phosphoryler des protéines bactériennes mais également des protéines d'autres organismes comme les phages. Ainsi, une étude a montré que Wzc, une BY-kinase d'*E. coli*, était capable de phosphoryler *in vitro* l'intégrase Int du coliphage HK022 sur des résidus tyrosyles (Kolot *et al.*, 2008). Les observations *in vivo* de suivi du processus de lysogénéisation ont montré que Wzc pouvait avoir un rôle dans la régulation de l'activité d'Int. En effet, il a été montré qu'une protéine Int purifiée à partir de bactéries surexprimant Wzc présentait une activité de recombinaison considérablement réduite *in vitro*.

De manière plus générale, et notamment grâce aux progrès techniques réalisés dans l'analyse à haut débit par spectrométrie de masse, un grand nombre de phosphoprotéines et de sites de phosphorylation ont pu être détecté et caractérisé. Cette approche a ainsi conduit à une augmentation considérable du nombre de phosphoprotéomes bactériens publiés (Macek *et al.*, 2007 ; Voisin *et al.*, 2007 ; Macek *et al.*, 2008 ; Soufi *et al.*, 2008 ; Lin *et al.*, 2009 ; Ravichandran *et al.*, 2009 ; Soung *et al.*, 2009 ; Parker *et al.*, 2010 ; Sun *et al.*, 2010 ; Ge *et al.*, 2011 ; Misra *et al.*, 2011). Les phosphoprotéines ainsi identifiées participent à diverses fonctions cellulaires allant du métabolisme du carbone, des protéines et de l'ADN à la division cellulaire en passant par la compétence ou la mobilité bactérienne. De façon surprenante aucune protéine phosphorylée sur la tyrosine n'est commune à tous ces phosphoprotéomes. De plus, certaines phosphoprotéines déjà connues ne sont pas détectées par cette approche. Ces observations sont dues au fait que ces résultats ne constituent qu'une image instantanée des phosphoprotéines de la bactérie à un instant donné, dans des conditions de cultures données, et ne sont en aucun cas exhaustifs. De ce fait, nous pouvons facilement anticiper sur la détection prochaine de nouvelles protéines phosphorylées sur la tyrosine. De plus, des études de phosphoprotéomique réalisées sur des souches invalidées pour l'expression de leurs BY-kinases pourraient nous permettre d'identifier de nouveaux substrats spécifiques des BY-kinases et ainsi, de nouveaux processus cellulaires dans lesquels les BY-kinases sont impliquées.

Néanmoins, ces approches globales ont permis d'aller plus loin dans la compréhension du rôle de la phosphorylation sur les résidus tyrosyles chez les bactéries. Pour illustrer ce point, l'analyse du phosphoprotéome de *B. subtilis* a conduit à l'identification de neuf nouvelles protéines phosphorylées sur la tyrosine (Macek *et al.*, 2007). La majorité de ces protéines est phosphorylable *in vitro* par la BY-kinase PtkA (Jers *et al.*, 2010). Dans cette étude, les auteurs

suggèrent que PtkA pourrait se dissocier de son modulateur membranaire, TkmA, lui permettant ainsi d'interagir avec des substrats cytosoliques ou d'autres modulateurs. En effet, il a été observé que la phosphorylation *in vitro* de différentes protéines par PtkA est affectée en présence de la protéine membranaire TkmA, ou en présence d'une protéine chimérique fusionnant PtkA directement au peptide activateur issu de TkmA. De manière surprenante, PtkA n'induit pas les mêmes effets sur ces protéines. En effet, elle peut jouer sur l'activité de certaines enzymes telles qu'Asd qui intervient dans la biosynthèse de l'aspartate ainsi que dans le métabolisme de la paroi cellulaire et YorK dont la fonction est inconnue mais qui possède une activité exonucléase sur de l'ADN simple brin. La phosphorylation de ces protéines peut également affecter la localisation cellulaire d'autres protéines telles que l'énolase (Eno) qui est localisée de façon différente selon que PtkA est exprimée ou non (**Fig. 12A et 12B**). Il a également été montré qu'OppA, qui appartient au complexe Opp formant une perméase pour l'import spécifique de petits peptides (3 à 5 acides-aminés de long), n'est plus exportée en absence de PtkA (**Fig. 12C et 12D**). Le rôle de la phosphorylation de ces protéines reste néanmoins difficilement interprétable si l'on se base sur ces seuls profils de localisation. Cependant, dans certains cas, comme ceux cités ci-dessus, des hypothèses intéressantes peuvent être avancées. Ainsi, la phosphorylation de OppA pourrait jouer un rôle dans son export et la présence élevée de Eno à un pôle de la cellule indique, quant à elle, que sa phosphorylation pourrait jouer un rôle dans la sporulation.

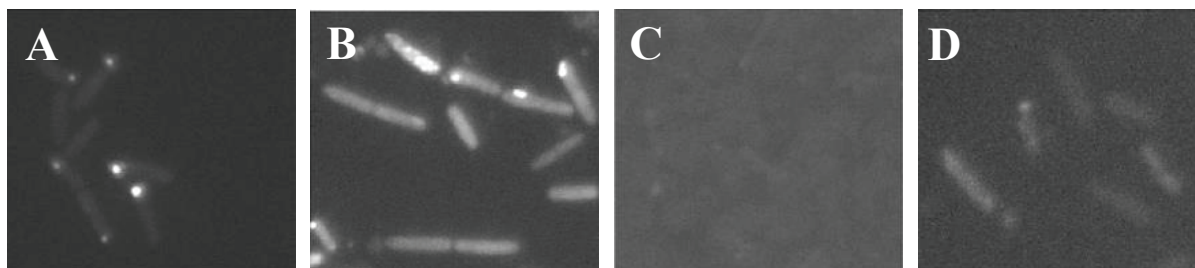


Figure 12 : Immuno-localisation de différents substrats de PtkA

Eno-YFP dans des souches sauvages (A) et $\Delta ptkA$ (B) en phase stationnaire. OppA-YFP dans des souches sauvages (C) et $\Delta ptkA$ (D) en phase stationnaire. D'après Jers *et al.*, 2010

Toutes ces observations illustrent la polyvalence et l'importance des BY-kinases dans les différentes voies physiologiques bactériennes (**Fig.13**). Cependant, ces différents rôles pourraient ne constituer qu'une faible partie de l'importance réelle de ces kinases chez les bactéries. De ce fait, la recherche de nouveaux substrats devrait permettre d'étendre ces études à la caractérisation de nouveaux processus de régulation.

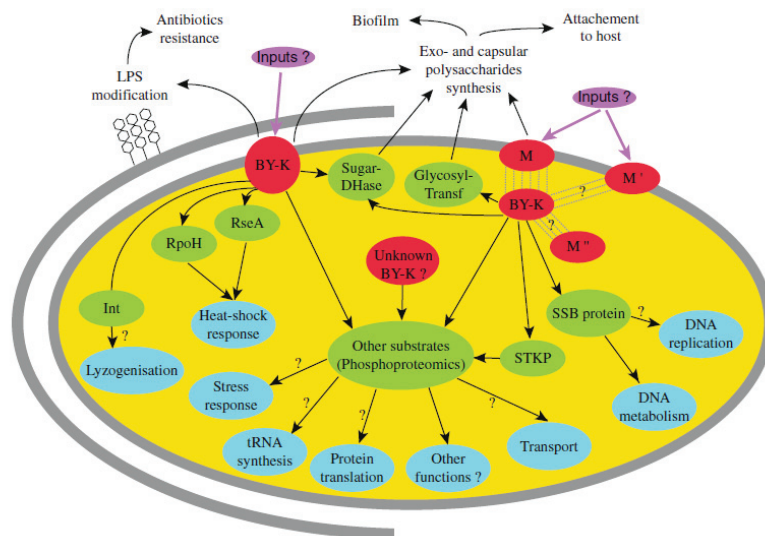


Figure 13 : Schéma reprenant l'ensemble des principaux événements de phosphorylation sur la tyrosine détectés chez les bactéries

Les BY-kinases (BY-K) et leurs modulateurs (M) sont représentés en rouge. M' et M'' représentent de potentiels modulateurs alternatifs. Les protéines endogènes phosphorylées par les BY-kinases et leurs fonctions associées sont respectivement représentées en vert et en bleu. Les stimuli potentiels qui pourraient influencer l'activité des BY-kinases figurent en violet. Les pointillés gris représentent les interactions entre les BY-kinases et leurs modulateurs. Les points d'interrogation représentent des relations espérées mais à démontrer. STPK : Sérine-Thréonine Protéine-Kinase, LPS : Lipopolysaccharide, Int : Intégrase, Sugar-DHase : UDP-sucrose-déshydrogénase, Glycosyl-transf : Glycosyl-transférase. D'après Béchet *et al.*, 2009

I.6 Régulation de la phosphorylation des BY-kinases

Les phosphotyrosine-phosphatases bactériennes catalysent la déphosphorylation des protéines phosphorylées sur un résidu tyrosyle. Comme indiqué à la fin de l'introduction, on retrouve trois familles différentes de phosphotyrosine-phosphatases : les phosphatases de type eucaryote (PTPs) et à double-spécificité (DSPs), les phosphotyrosine-phosphatases de basse masse moléculaire (LMW-PTPs) et les polymérase-histidinol phosphatases (PHPs). Les PTPs, les DSPs et les LMW-PTPs utilisent un mécanisme catalytique commun dépendant d'un motif CX₅R conservé au niveau de la boucle de fixation appelée « P-loop » (Kennelly et Potts, 1999). Au sein de ce motif, la cystéine joue le rôle du nucléophile permettant d'attaquer le groupement phosphate du résidu phosphotyrosyle de la protéine substrat (Ramponi et Stefani, 1997), alors que le résidu arginyle stabilise le substrat au niveau de la poche catalytique par interaction avec la

moitié phosphate de la phosphotyrosine (Tiganis, 2002). L'activité des phosphatases est également contrôlée par un résidu aspartyle conservé au sein de la boucle D (« D-loop ») (Schubert *et al.*, 1995) (**Fig. 14**).

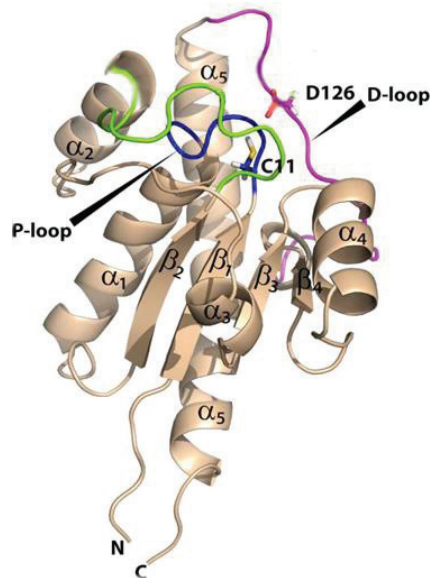


Figure 14 : Structure de MtpA, la LMW-PTP de *M. tuberculosis*.

Représentation en ruban. La P-loop (C¹¹-R¹⁷) est colorée en bleu tandis que la D-loop (R¹¹¹-D¹³¹) est colorée en rose. Les chaînes latérales des résidus essentiels à l'activité de cette LMW-PTP (C¹¹ et D¹²⁶) sont représentées en bâton. D'après Stehle *et al.*, 2012

Les phosphotyrosine-phosphatases interviennent dans deux processus principaux : la production des polysaccharides (Vincent *et al.*, 1999 ; Morona *et al.*, 2000a) et sa sécrétion comme protéines effectrices afin d'interférer avec différentes fonctions cellulaires de l'organisme hôte (Bliska, 2000 ; Castandet *et al.*, 2005). Néanmoins, elles peuvent avoir des fonctions opposées. En effet, dans certains cas elles sont capables d'antagoniser les fonctions des BY-kinases alors que dans d'autres elles peuvent les stimuler (Zhang, 2005). Par ailleurs, chez les bactéries à Gram-négatif, le gène codant pour les LMW-PTPs est généralement situé juste en amont de celui codant pour sa BY-kinase associée. Il en est de même avec les PHPs chez les bactéries à Gram-positif. Ainsi, les BY-kinases et leurs phosphotyrosine-phosphatases associées semblent former un couple protéique capable de réguler différents processus cellulaires tels que la synthèse de polysaccharides extracellulaires chez différentes espèces bactériennes (Vincent *et al.*, 1999 ; Morona *et al.*, 2000a).

II Les polysaccharides extracellulaires

Plusieurs types de polysaccharides sont synthétisés par les cellules procaryotes. On retrouve notamment les polysaccharides intracellulaires servant généralement de réserve énergétique (glycogène), les polysaccharides structuraux tels que les lipopolysaccharides (LPS), le peptidoglycane ou encore l'acide téichoïque, participant à l'architecture de la paroi cellulaire, et les polysaccharides extracellulaires. Ces derniers ont un rôle important dans différents processus biologiques tels que la protection de la bactérie vis-à-vis de son environnement ou encore la virulence des bactéries pathogènes. Nous allons à présent voir une présentation générale des polysaccharides extracellulaires ainsi qu'un approfondissement sur les modes de synthèse et d'export du polysaccharide capsulaire de la bactérie pathogène *S. pneumoniae* pour laquelle il est le facteur de virulence majeur.

II.1 Présentation générale

II.1.i Définition

L'export de polysaccharides extracellulaires est retrouvé chez de nombreuses bactéries à Gram-positif comme à Gram-négatif. Ils sont constitués soit par une répétition d'un même monomère saccharidique (homo-polysaccharide) soit par une répétition de monomères différents (hétéro-polysaccharide). Ces chaînes saccharidiques peuvent alors fixer d'autres groupements chimiques tels que des acétates, des pyruvates, des succinates ou encore des phosphates afin de former des polymères anioniques fortement hydratés. Ces polymères ont une masse moléculaire très élevée comprise entre 10^5 et 10^6 Da. Les monomères saccharidiques les plus régulièrement retrouvés sont le glucose, le galactose et le rhamnose pour les oses neutres ainsi que l'acide glucuronique et l'acide galacturonique pour les oses acides. La très grande majorité des polysaccharides retrouvés sont de type hétérogène et présentent des répétitions de 2 à 10 oses de complexité variable et peuvent être linéaires ou ramifiés.

Les polysaccharides extracellulaires sont retrouvés sous deux formes différentes dépendant de leur capacité d'interaction avec la surface bactérienne. En effet, on peut différencier les exopolysaccharides (EPS), qui ne sont retenus à la surface de la cellule que par de faibles interactions et qui peuvent même être relargués, des polysaccharides capsulaires (CPS) qui sont

liés de façon covalente à la surface bactérienne au niveau de phospholipides ou du lipide A du LPS.

II.1.ii Rôles physiologiques des polysaccharides extracellulaires

Les polysaccharides capsulaires (CPS) et les exopolysaccharides (EPS) jouent un rôle essentiel dans l'adaptation de la bactérie à son environnement mais aussi dans leur potentielle virulence. Concernant leur rôle dans l'adaptabilité bactérienne, il a été proposé que la capacité de production d'EPS constitue une réponse directe aux pressions sélectives de l'environnement (Dudman, 1964). En effet, la variabilité en oses et les différentes ramifications possibles conduisent à une très grande diversité de structures polysaccharidiques témoignant, d'une part, du grand nombre de sérotypes différents pour une espèce donnée mais également de la capacité d'adaptation des bactéries à leur environnement.

Le caractère anionique des polysaccharides extracellulaires leur permet, *via* leur capacité à fixer des molécules cationiques, de favoriser l'apport en minéraux essentiels et en nutriments nécessaires à la croissance bactérienne (Costerton *et al.*, 1981) ou de bloquer l'entrée d'ions métalliques toxiques. De plus, la nature visqueuse de la couche de polysaccharides extracellulaires a un effet extrêmement important sur les propriétés de diffusion de molécules pour leur entrée ou sortie de la cellule (Allison and Matthews, 1992). C'est notamment le cas dans le blocage de la pénétration des antibiotiques tels que les peptides antimicrobiens cationiques (Campos *et al.*, 2004). Enfin, les polysaccharides extracellulaires protègent la bactérie des phénomènes de dessiccation du fait de leur caractère fortement hydraté (Schnider-Keel *et al.*, 2001).

Dans le cas des bactéries pathogènes, il a été montré que les polysaccharides capsulaires protègent la bactérie contre le système immunitaire de l'hôte. En effet, sa présence diminue la capacité d'interaction entre la bactérie et le phagocyte et empêche l'activation du complément. De plus, elle permet de dissimuler les structures antigéniques à la surface de la bactérie la soustrayant ainsi à l'action des anticorps (Roberts, 1996). On peut également noter que l'extrême variabilité de séquence des polysaccharides bactériens rend ces molécules très faiblement immunogènes. Cette immunogénicité est d'autant plus affaiblie du fait que ces polysaccharides

peuvent posséder certaines similarités avec les glycolipides et les glycoprotéines présents chez la cellule hôte (Weintraub, 2003). Enfin, les CPS favorisent également la formation de biofilms permettant, eux aussi, de protéger les bactéries contre les antibiotiques. Pour l'ensemble de ces raisons, la présence de CPS chez une bactérie pathogène est très souvent assimilée à un facteur de virulence majeur.

II.2 Mécanismes de biosynthèse et d'export des polysaccharides extracellulaires

La présence de polysaccharides à l'extérieur de la bactérie constitue un défi majeur du transport cellulaire. En effet, du fait de leur très faible hydrophobicité et de leur masse moléculaire élevée, il n'est pas concevable d'imaginer que les polysaccharides extracellulaires puissent traverser une, voire deux, membrane lipidique et une couche de peptidoglycane de manière passive. Ainsi, la présence de complexe de synthèse et d'export des polysaccharides a été démontrée chez de nombreuses bactéries telles qu'*E. coli* (Whitfield, 2006) et *S. pneumoniae* (Yother, 2011). Il est intéressant de noter que malgré l'hétérogénéité des polysaccharides produits, seulement deux mécanismes généraux de biosynthèse et d'export des polysaccharides extracellulaires ont été décrits : le système Wzy-dépendant et le système ABC-transporteur-dépendant.

II.2.i Le système Wzy-dépendant

Le système Wzy-dépendant est le mécanisme de biosynthèse des polysaccharides extracellulaires le plus répandu (**Fig. 15**). Dans ce système, après assemblage des sous-unités polysaccharidiques dans le cytoplasme, ces dernières sont assemblées sur un lipide porteur, l'undécaprényl-pyrophosphate (und-PP), par des glycosyl-transférases (WbaP chez *E. coli*) au niveau du compartiment cytoplasmique. Ces sous-unités traverseraient alors la membrane interne de la bactérie grâce à une flippase (Wzx chez *E. coli*) pour laquelle le mécanisme d'action demeure méconnu. La polymérisation et l'élongation du polysaccharide extracellulaire se dérouleraient alors dans le compartiment périplasmique chez les bactéries à Gram-négatif. Elle se ferait par l'ajout d'un polymère en construction sur l'extrémité réductrice d'une sous-unité nouvellement synthétisée. Cette réaction est catalysée par une polymérase (Wzy chez *E. coli*) (Woodward *et al.*, 2010). Au sein de ce complexe de synthèse et d'export des polysaccharides

extracellulaires, on retrouve également une BY-kinase (Wzc chez *E. coli*). En effet, le domaine extracellulaire des BY-kinases présente une similarité de structure secondaire avec certaines protéines membranaires appartenant à la famille des PCP-2a (« Polysaccharides Co-Polymérase 2a ») qui permettent de réguler la longueur de la chaîne polysaccharidique (Dodgson *et al.*, 1996). Il a notamment été montré que la phosphorylation de Wzc, ainsi que sa déphosphorylation par sa phosphatase associée Wzb, était essentielle à l'assemblage de la capsule polysaccharidique (Obadia *et al.*, 2007). Chez les bactéries à Gram-négatif, les BY-kinases jouent également un rôle essentiel dans la translocation du polymère du périplasma vers la surface bactérienne. Cette activité se ferait en partenariat avec une protéine de la famille des OPX (« Outer-membrane Polysaccharide eXport ») (Wza chez *E. coli*) (cf. § I.4.ii) (**Fig.15**).

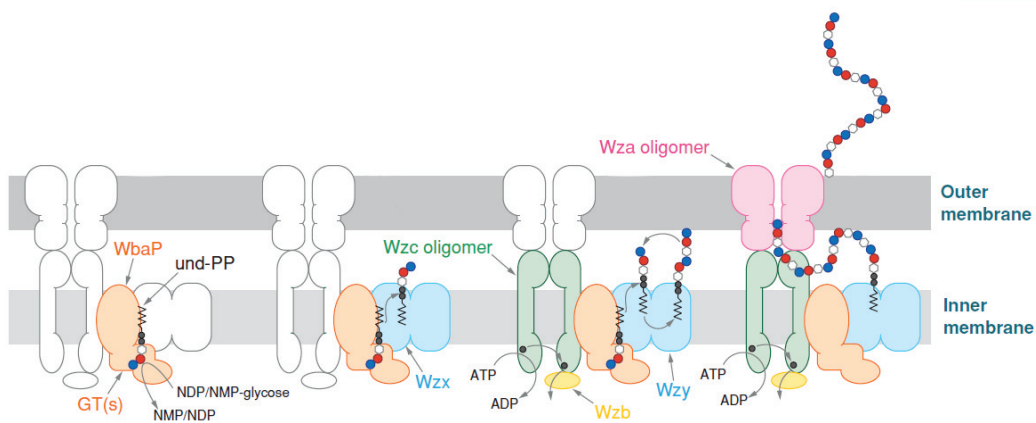


Figure 15 : Modèle de synthèse et d'export des polysaccharides extracellulaires Wzy-dépendant

Les sous-unités liées à l'und-PP sont assemblées à l'interface entre le cytoplasme et la membrane interne. Une fois synthétisées, ces sous-unités traversent la membrane interne grâce à l'action de la flippase Wzx. Elles deviennent alors des substrats pour la polymérase Wzy qui les assemble par transfert de la chaîne en formation sur la sous-unité nouvellement formée. Le fonctionnement de cette polymérisation requiert l'autophosphorylation des résidus tyrosyles présents à l'extrémité C-terminale de Wzc ainsi que leur déphosphorylation par Wzb. Le polymère ainsi formé est alors exporté au travers de la membrane externe par Wza. D'après Whitfield, 2006

II.2.ii Le système ABC-transporteur-dépendant

Ce système diffère du précédent par le fait que le polymère polysaccharidique est polymérisé dans le compartiment cytoplasmique de la bactérie et non plus au niveau du périplasma (**Fig. 16**). En effet, dans le système ABC-transporteur-dépendant, la chaîne polysaccharidique s'assemble sous-unité par sous-unité, au niveau des extrémités non-réductrices, sur un accepteur lipidique (Troy, 1992). L'assemblage est réalisé par des glycosyl-

transférases et ne requiert donc pas de polymérase. Bien que la nature de l'accepteur lipidique demeure méconnue à ce jour, il est probable que ce soit un résidu diacylglycérophosphate chez *E. coli*. En effet, il a été observé que le polysaccharide exporté est fixé à ce résidu (Finke *et al.*, 1991). Une fois synthétisé, le polymère polysaccharidique est exporté à travers la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire d'un ABC-transporteur (KpsM chez *E. coli*) (Bliss and Silver, 1997). L'intervention de deux nouvelles protéines est alors nécessaire pour son export vers la surface bactérienne. Un oligomère d'une protéine appartenant à la famille des OPX jouerait le rôle de canal (KpsD chez *E. coli*) tandis qu'une co-polymérase de la famille des PCP-3 permettrait de relier l'ABC-transporteur au canal formé par l'oligomère d'OPX (KpsE chez *E. coli*) (Silver *et al.*, 2001) (**Fig. 16**).

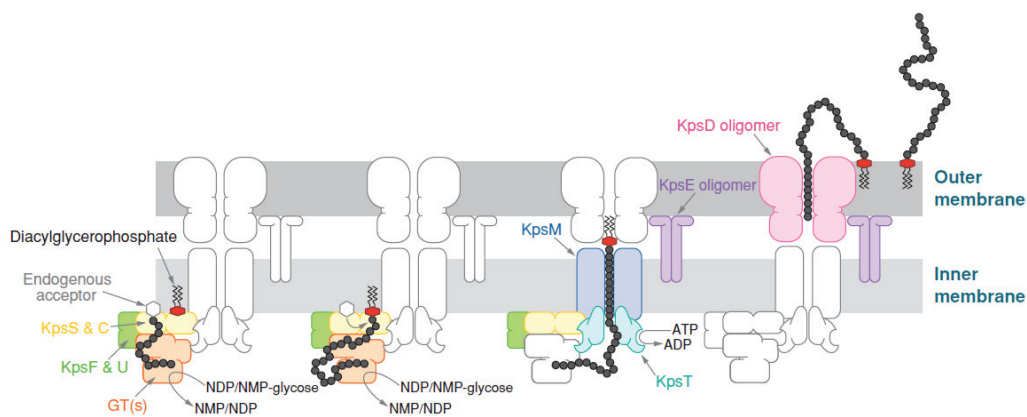


Figure 16 : Modèle de synthèse et d'export des polysaccharides extracellulaires ABC-transporteur-dépendant

La formation du polymère est initiée par le transfert de sucres sur un accepteur encore méconnu et s'étend grâce à l'action successive de plusieurs glycosyl-transférases. Le produit final est transféré sur une molécule de diacylglycérophosphate. Le polymère est exporté par l'action d'un transporteur ABC (KpsM et KpsT). KpsS et KpsC sont essentielles à ce processus et KpsF et KpsU ont également leur rôle à jouer. Cependant, ces rôles demeurent largement méconnus. La translocation du polysaccharide au travers de la membrane externe requière les protéines KpsE et KpsD. D'après Whitfield, 2006

II.3 La capsule polysaccharidique de *Streptococcus pneumoniae*

Le pneumocoque est une bactérie à Gram-positif pour laquelle plus de 90 sérotypes sont aujourd'hui connus. Chacun de ces sérotypes possède une capsule polysaccharide dont la composition chimique est différente. De plus, il semblerait que cette composition ait un rôle dans le degré de virulence des différentes souches de pneumocoque (Weinberger *et al.*, 2009). En effet, la capsule polysaccharidique constitue l'un des facteurs de virulence majeur du fait de son

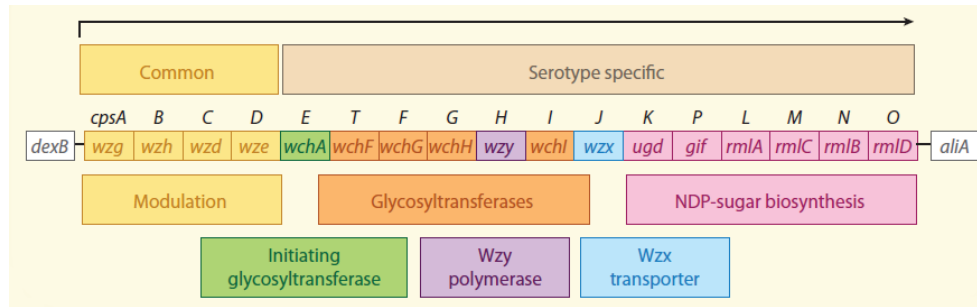


Figure 18 : Schéma de l'opéron *cps* du sérotype 2 de *S. pneumoniae*

La flèche représente le transcrit prédit. Les gènes *dexB* et *aliA* encadrent cet opéron mais ne sont pas nécessaires à la synthèse de la capsule polysaccharidique. NDP-sugar : nucléotide diphospho-sucrose. D'après Yother *et al.*, 2011

L'expression de cet opéron est sous la dépendance d'un unique promoteur qui se situe en amont de *cpsA* et tous les gènes semblent être transcrits au même moment (Guidolin *et al.*, 1994). On retrouve également un site de fixation du ribosome pour chaque gène. Il a été proposé que CpsA soit un régulateur transcriptionnel du fait de son homologie avec les protéines de la famille LytR (Guidolin *et al.*, 1994) et de la diminution de la production du polysaccharide capsulaire lorsque *cpsA* est invalidé (Morona *et al.*, 2000a). Cependant, une réduction significative de la transcription des gènes de l'opéron *cps* en absence de *cpsA* n'a jamais été démontrée. Une étude récente a de plus montré que CpsA pourrait avoir une fonction différente en participant à la fixation de la capsule à la paroi du pneumocoque (Eberhardt *et al.*, 2012).

II.3.iii Voie de biosynthèse de la capsule polysaccharidique de type 2

Comme dans les autres voies de synthèse Wzy-dépendantes, l'initiation de la synthèse de la capsule polysaccharidique se fait grâce au transfert réversible d'un UDP-glucose sur l'undécaprényl-phosphate (Und-P) (**Fig. 19**). La formation de l'UDP-glucose est catalysée par la glycosyl-transférase CpsE (WbaP chez *E. coli*, **Tab. 1**) (Bentley *et al.*, 2006). Cette enzyme possède 5 passages transmembranaires et un large domaine cytoplasmique. Il a été montré que de nombreux résidus présents au sein de ce domaine sont essentiels à l'activité de la glycosyl-transférase (James *et al.*, 2013). On retrouve également un large domaine extracellulaire dont le rôle est aujourd'hui encore peu connu. Il a été suggéré que ce domaine puisse être important dans l'interaction entre cette protéine et les autres protéines du complexe de synthèse et d'export du polysaccharide capsulaire (Xayarath and Yother, 2007). Après l'initiation de la synthèse de la

sous-unité, d'autres sucres sont ajoutés par différentes glycosyl-transférases (CpsT, CpsF, CpsG et CpsI) (James *et al.*, 2013).

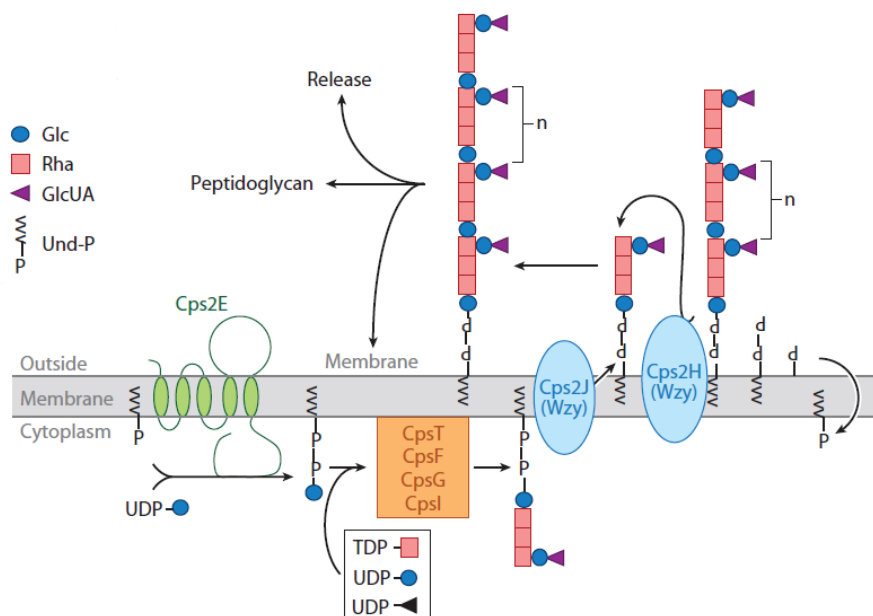


Figure 19 : Modèle de synthèse et d'export de la capsule polysaccharide du sérotype 2 de *S. pneumoniae*
 L'UDP-GlcUA et le TDP-Rha sont synthétisés par les NTP-sucre synthétases Cps2K, Cps2L, Cps2M, Cps2N et Cps2O absentes de ce schéma. L'UDP-Glc vient quant à lui du pool cellulaire. La glycosyl-transférase Cps2E permet d'initier la formation de la sous-unité polysaccharidique *via* le transfert d'une molécule d'UDP-Glc sur le lipide porteur (Und-P). Les glycosyl-transférases Cps2T, Cps2F, Cps2G et Cps2I agissent successivement afin de former les sous-unités polysaccharidiques. La flippase Cps2J permet de faire passer le précurseur polysaccharidique au travers de la membrane plasmique. La polymérase Cps2H permet alors le transfert d'un polymère polysaccharidique en formation sur ce précurseur nouvellement synthétisé. Le polymère polysaccharidique reste alors, dans la majorité des cas, lié au peptidoglycane mais peut aussi être relargué. Rha : Rhamnose, Glc : Glucose et GlcUA : acide glucuronique, Und-P : undécaprényl-phosphate. D'après Yother, 2011

Le transfert du polysaccharide au travers de la membrane ainsi que la polymérisation de ce dernier pourraient être réalisés respectivement par les protéines CpsJ (protéine homologue à Wzx, **Tab. 1**) et CpsH (protéine homologue à Wzy, **Tab. 1**) (**Fig. 19**). Cependant, l'activité de ces deux protéines n'a jamais été démontrée. On sait néanmoins qu'elles sont essentielles à la survie du pneumocoque. En effet, la délétion des gènes codant pour ces protéines n'est réalisable qu'en présence de mutations suppressives au sein des boucles cytoplasmiques et extracellulaires de CpsE (Xayarath and Yother, 2007). Il a été proposé que cette létalité soit due soit à la séquestration de l'accepteur lipidique Und-P, également nécessaire à la synthèse du peptidoglycane, soit à la déstabilisation de la membrane du fait de l'accumulation de précurseurs polysaccharidiques.

<i>E. coli</i>		<i>S. pneumoniae</i>
WbaP	Glycosyl-transférase	CpsE
Wzx	Flippase	CpsJ
Wzy	Polymérase	CpsH
Wza	Lipoprotéine	
Wzb	Phosphatase	CpsB
Wzc	BY-kinase	CpsC/D

Tableau 1 : Correspondance entre les protéines appartenant au complexe de synthèse et d'export du polysaccharide capsulaire d'*E. coli* et de *S. pneumoniae*

Chez les bactéries à Gram-positif produisant de la capsule polysaccharidique, la majorité des polymères formés reste attachée au peptidoglycane ou à des composants membranaires. Chez *S. pneumoniae*, la protéine permettant de lier le polymère polysaccharidique au peptidoglycane n'a pas encore été identifiée. Comme mentionné précédemment, il a récemment été proposé que CpsA permette la fixation de ce polymère à la paroi cellulaire du fait de son activité pyrophosphatase et de sa capacité à lier l'undécaprényl-pyrophosphate au niveau de sa boucle extracellulaire (Eberhardt *et al.*, 2012).

Comme décrit précédemment pour les systèmes Wzy-dépendant (cf. § II.2.i), on retrouve une BY-kinase au sein du complexe de synthèse et d'export des polysaccharides capsulaires du pneumocoque. Cette BY-kinase est composée de deux protéines codées par deux gènes distincts. Une protéine transmembranaire possédant une grande boucle extracellulaire, CpsC, et une protéine cytoplasmique possédant l'activité tyrosine-kinase et les sites d'autophosphorylation, CpsD (Wzc chez *E. coli*, **Tab. 1**). A partir d'études réalisées chez *S. aureus* (Soulat *et al.*, 2006), l'interaction entre ces deux protéines, *via* l'extrémité C-terminale de CpsC, pourrait être nécessaire et suffisante à l'activation de l'activité kinase de CpsD. Il a été montré que chacune de ces protéines était essentielle à une synthèse correcte de polysaccharides. En effet, lorsque l'on inactive les gènes codant pour ces deux protéines, la capsule est produite en plus faible quantité (Morona *et al.*, 2000a) et le polymère est de taille réduite (Bender *et al.*, 2003). Cependant, il semblerait que la capsule soit toujours correctement exportée et fixée au peptidoglycane (Bender *et al.*, 2003). Ainsi, ni CpsC ni CpsD ne joueraient un rôle dans la fixation du polysaccharide

capsulaire à la paroi cellulaire bien qu'un rôle accessoire de CpsC ait été rapporté (Morona *et al.*, 2006). Dans ces mutants, il a également été observé que la synthèse de CPS était affectée au niveau de sa localisation (Henriques *et al.*, 2011) (**Fig. 20**). En effet, en absence de CpsC et de CpsD, les CPS ne sont plus produits au site de division du pneumocoque. A partir de cette observation, il a été proposé que deux machineries de synthèse du CPS puissent exister chez le pneumocoque : une première responsable de la synthèse septale de CPS et qui serait dépendante de la présence de CpsC et de CpsD et une seconde responsable de la synthèse périphérique de CPS et qui ne serait pas dépendante de CpsC et CpsD (Henriques *et al.*, 2011).

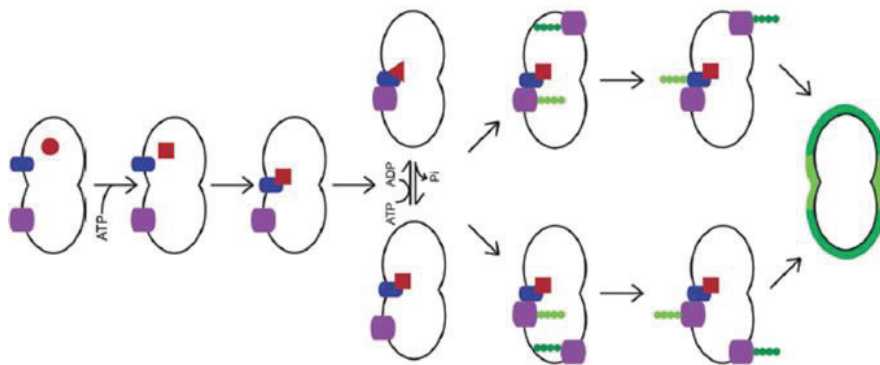


Figure 20 : Modèle de régulation de la synthèse des CPS par CpsC et CpsD.

CpsD (rouge) interagit avec CpsC (bleu) afin de recruter la machinerie de synthèse de CPS (violet) au site de division. A cet instant, le complexe est soumis à des cycles de phosphorylation/déphosphorylation du YC de CpsD. Deux hypothèses sont alors proposées : CpsC et CpsD sont des activateurs de la synthèse septale des CPS ou alors ces deux protéines agissent tel un transporteur de CPS interagissant avec la machinerie de synthèse afin d'exporter les CPS au travers de la membrane plasmique au site de division. Ces deux hypothèses envisagent que la machinerie de synthèse des CPS permet d'assurer, en absence de CpsC et de CpsD, une synthèse périphérique de CPS. D'après Henriques *et al.*, 2011)

La phosphatase associée à ce système, CpsB (équivalent de Wzb chez *E. coli*, **Tab. 1**), appartient à la famille des phosphoestérases PHP (« polymérase-histidinol phosphatase ») qui ne présente aucune homologie structurale avec les phosphatases retrouvées chez les bactéries à Gram-négatif (Morona *et al.*, 2002). L'inactivation du gène codant pour cette phosphatase conduit à une hausse d'environ 40 % du niveau de phosphorylation de CpsD. De plus cette souche semble produire plus de polysaccharides capsulaires de taille inchangée (Bender *et al.*, 2003). Ainsi, en accord avec ce qui a été montré chez *E. coli* (Obadia *et al.*, 2007), la déphosphorylation de CpsD, médiée par CpsB, est essentielle dans le contrôle de la quantité de

capsule produite. Néanmoins, une différence majeure est qu'elle ne semble pas être essentielle à la synthèse d'un polymère de haute masse moléculaire chez le pneumocoque.

De nos jours, le lien entre la phosphorylation de CpsD et la synthèse de la capsule polysaccharidique demeure largement méconnu et il semblerait que la situation soit encore plus complexe que suspecté. En effet, il a récemment été montré que l'activité phosphatase de CpsB était accentuée en condition de haute concentration en oxygène. Par ailleurs, cette hausse d'activité conduirait à une diminution de la synthèse du polysaccharide capsulaire (Geno *et al.*, 2014).

Déterminer le rôle de l'autophosphorylation de CpsD dans la biosynthèse et l'export de la capsule du pneumocoque a donc été un objectif majeur de mon travail de thèse. Au cours de celui-ci, j'ai mis en évidence un lien entre la production de capsule et le cycle cellulaire du pneumocoque. C'est pourquoi dans cette dernière partie, je présente les connaissances générales des mécanismes de division cellulaire chez le pneumocoque.

III La division bactérienne

La division cellulaire est un processus fondamental qui permet la séparation d'une cellule en deux cellules filles identiques et possédant le même patrimoine génétique. Ce processus débute par la mise en place d'un complexe protéique, le divisome, au milieu de la bactérie. Ce complexe permet la constriction de la cellule pour donner naissance et assurer la séparation des deux cellules filles. En parallèle, le chromosome de la bactérie est dupliqué et les deux copies ainsi formées sont ségréguées de part et d'autre du septum en formation afin que chaque cellule fille ait la même information génétique. Enfin, des hydrolases permettent de remodeler la paroi septale afin de séparer définitivement les cellules filles. L'ensemble de ces processus doit être finement coordonné et nécessite la mise en place de différents mécanismes de régulation spatio-temporelle. Les études sur des organismes modèles tels qu'*E. coli* et *B. subtilis* ont permis de formuler des modèles robustes de fonctionnement de la machinerie de division. Cependant, il est vite apparu que ces modèles ne pouvaient pas être transposés à toutes les espèces bactériennes. En effet, chez des bactéries telles que *C. crescentus*, dont la multiplication nécessite des stades de développement différenciés, les mécanismes et les protéines mis en jeu sont très différents de

ceux identifiés chez *B. subtilis* et *E. coli* (Margolin, 2006). De plus, on peut noter que toutes les protéines identifiées comme intervenant dans la division cellulaire chez ces deux bactéries modèles ne sont pas retrouvées chez toutes les espèces bactériennes (**Tab. 2**). Ainsi, chez le pneumocoque, on ne retrouve ni les protéines MinD/E/J qui contrôlent la mise en place du septum au centre de la bactérie, ni ParA qui intervient dans la ségrégation du chromosome, ni MreB qui est nécessaire à l'allongement de la cellule. De ce fait, on peut anticiper que les mécanismes moléculaires assurant la division du pneumocoque sont différents de ceux décrits chez *B. subtilis* et *E. coli*.

III.1 Le fonctionnement du divisome

Le divisome est un complexe protéique composé d'une dizaine de protéines conservées. Ces protéines interviennent dans la constriction de la cellule mais également dans d'autres processus indispensables à la production de deux cellules filles identiques tels que la synthèse du peptidoglycane, qui assure l'élongation de la cellule et la synthèse de la paroi septale, la ségrégation des chromosomes nouvellement répliqués et la séparation finale des cellules filles par remodelage de la paroi septale par des hydrolases. Afin d'assurer le bon déroulement de la division cellulaire, les activités engendrées par ces protéines ont besoin d'être régulées et coordonnées. Dans la suite de mon exposé, je vais présenter les grandes lignes de l'état des connaissances concernant ces mécanismes.

Species	Shape*	Cell wall synthesis and cytokinesis								Chromosome biology and division site selection											
		MreB	MreC	MreD	FtsZ	FtsA	StkP	EzrA	GpsB	DivIVA	MinC	MinD	MinE	MinJ	Noc [†]	SlimA	ParA	ParB	Smc	FtsK	
Firmicutes																					
<i>Bacillus subtilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		-	+	+ [§]	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
<i>Streptococcus agalactiae</i> [¶]		-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
<i>Lactococcus lactis</i>		-	+	+ [§]	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
<i>Enterococcus faecalis</i>		-	+	+ [§]	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+		
<i>Pediococcus pentosaceus</i>		-	+	+ [§]	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		+	+	+ [§]	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+		
<i>Staphylococcus aureus</i>		-	+	+ [§]	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+		
<i>Veillonella parvula</i>		+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+		
Proteobacteria																					
<i>Escherichia coli</i>		+	+	+	+	+	- [†]	-	-	-	+	+	+	-	-	+	- [†]	- ^{**}	+		
<i>Caulobacter crescentus</i>		+	+	+ ^{††}	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+		
Actinobacteria																					
<i>Micrococcus luteus</i>		-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+		
Proteobacteria																					
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+		
<i>Moraxella catarrhalis</i>		-	-	-	+	+	-	-	-	-	- ^{§§}	+	+	-	-	-	+	+	+		
<i>Azotobacter vinelandii</i>		+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+		
Deinococcus-Thermus																					
<i>Deinococcus radiodurans</i>		-	-	-	+	+	- [†]	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+		
Cyanobacteria																					
<i>Synechocystis</i> spp.		+	+	-	+	-	- [†]	-	-	-	- ^{§§}	+	+	-	-	-	+	+	+		

Tableau 2 : Conservation des protéines intervenant dans la division cellulaire et la ségrégation des chromosomes chez différentes bactéries

La présence ou l'absence des protéines a été déterminée par BLASTP en utilisant les séquences de *B. subtilis* et *E. coli* et ProteinorthoBLAST pour trouver les différents orthologues. Les pointillés représentent les plans de division possibles. Les couleurs rouges et bleues correspondent respectivement aux bactéries à Gram-négatif ou à Gram-positif. Noc : exclusion du nucléoïde. Noc est un homologue de ParB. Les protéines sont identifiées comme Noc seulement s'il y a déjà une protéine identifiée comme ParB. D'après Pinho *et al.*, 2013

III.1.i La synthèse du peptidoglycane

Le peptidoglycane est une macromolécule hétéro-polymérique dont l'architecture de base est fortement conservée d'une bactérie à l'autre (Schleifer et Kandler, 1972). L'ossature de base de ce polymère est composée de chaînes polysaccharidiques dans lesquelles on retrouve un enchaînement linéaire d'unités disaccharidiques de N-acétyl-glucosamine (GluNAc) et d'acide

N-acétyl-muramique (MurNAc) reliées par une liaison osidique β -1.4 (**Fig. 21**). Ces unités sont interconnectées par des chaînes peptidiques au niveau de la fonction carboxyle de l'acide D-lactique du MurNAc. Enfin, ces oligopeptides sont interconnectés au niveau de l'acide aminé dibasique en position 3 d'un peptide et la D-alanine en position 4 du peptide voisin de façon directe ou indirecte.

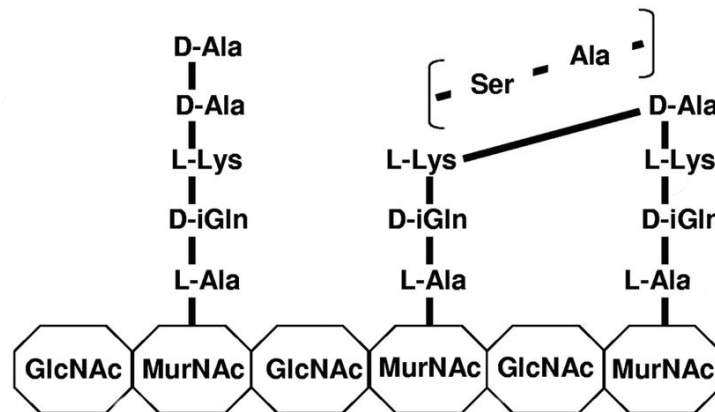


Figure 21 : Architecture de base du peptidoglycane de *S. pneumoniae*

Les chaînes oligopeptidiques sont interconnectées soit directement soit *via* un dipeptide Ser-Ala. GluNAc : N-acétyl-glucosamine, MurNAc : acide N-acétyl-muramique. D'après Barendt *et al.*, 2011

La biosynthèse de ce composé débute dans le cytoplasme par l'addition des résidus composant la chaîne peptidique sur l'uridyl-diphosphate-N-acétyl-muramique (UDP-MurNAc) (**Fig. 22**). Cette réaction est catalysée par des protéines de la famille Mur et mène à la formation de l'UDP-MurNAc-pentapeptide. Chez le pneumocoque, par exemple, la chaîne pentapeptidique est composée d'une alternance de L- et D-aminoacides. On retrouve une L-alanine suivie d'une D-isoglutamine puis une L-lysine précédant deux D-alanines. Les liaisons interpeptidiques peuvent être directes, entre la L-lysine et la première D-Alanine, ou indirectes par l'intermédiaire de ponts dipeptidiques de type Ser-Ala. La première étape membranaire fait intervenir une translocase, MraY, et consiste au transfert du motif phospho-MurNAc-pentapeptide sur l'undécaprénol-phosphate pour former un polymère appelé lipide 1. Une transférase, MurG, ajoute alors le GluNAc à ce lipide (**Fig. 22**). Le polymère ainsi formé est appelé lipide 2 et est transloqué au travers de la membrane cytoplasmique. Le mécanisme permettant cette translocation reste non élucidé mais il semblerait qu'il fasse intervenir des protéines de type flippase (Ehlert et Holtje, 1996 ; Ghuysen et Goffin, 1999). Chez le pneumocoque, deux protéines flippases, FtsW et RodA, ont été identifiées. De plus, une troisième, MurJ, pourrait

également avoir cette fonction (Sham *et al.*, 2014). Une fois transloqué, le lipide 2 est alors intégré au peptidoglycane existant par l'intermédiaire de réactions de transglycosylation et de transpeptidation. Ces réactions sont catalysées par des enzymes appelées PBP pour « Penicillin Binding Protein ».

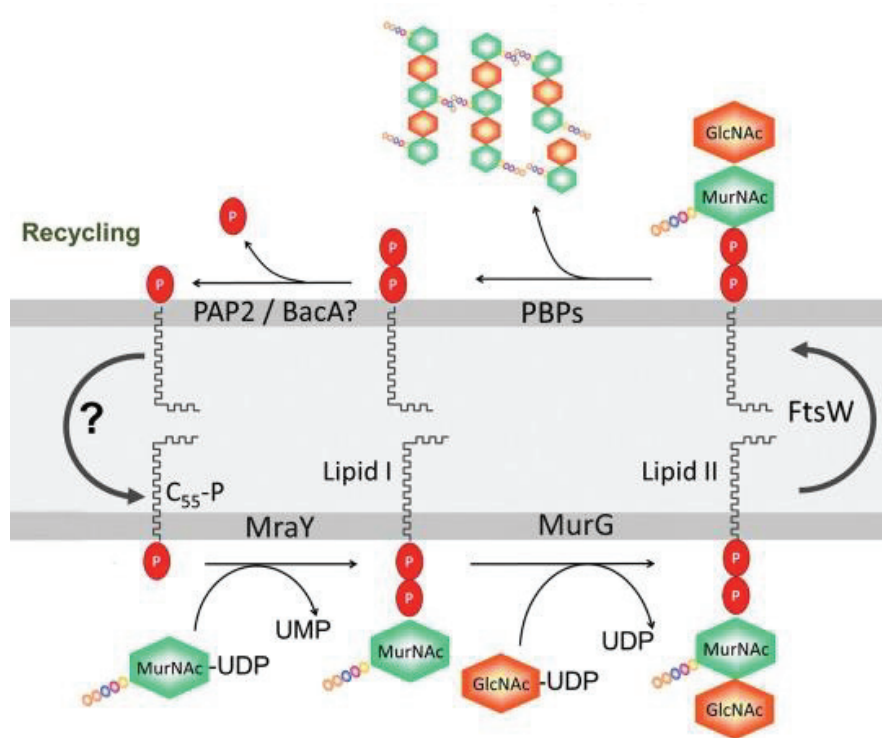


Figure 22 : Synthèse du peptidoglycane

MraY permet le transfert du composé de base du peptidoglycane sur l'undécaprénol-phosphate (C₅₅-P) afin de former le lipide I. La transférase MurG ajoute alors un GlcNAc sur ce lipide I donnant ainsi naissance au lipide II. Ce lipide traverse la membrane plasmique grâce à la flippase FtsW afin de rejoindre le périplasm dans lequel les réactions de polymérisation du peptidoglycane ont lieu grâce aux PBP. Le lipide porteur est relâché sous sa forme pyrophosphate (C₅₅-PP) et doit être déphosphorylé afin d'être recyclé. UDP : uridyl-diphosphate, UMP : uridyl-monophosphate, GlcNAc : N-acétyl-glucosamine, MurNAc : N-acétyl-muramique. D'après Manat *et al.*, 2014

Les gènes codant pour les flippases et les PBP sont très fréquemment retrouvés au sein d'un même opéron. De plus, il a été observé que la délétion des gènes codant pour les flippases conduisait au même phénotype que celui obtenu lors de la délétion du gène codant pour la PBP associée (de Pedro *et al.*, 2001 ; Thibessard *et al.*, 2002). Sur la base des phénotypes observés chez *E. coli*, il a été proposé que deux systèmes de synthèse du peptidoglycane soient présents. Un système permet la synthèse périphérique de peptidoglycane conduisant à l'élongation de la bactérie et faisant intervenir la flippase RodA et PBP2 (Thibessard *et al.*, 2002). Un second

permet la synthèse septale de peptidoglycane et fait intervenir la flippase FtsW et PBP3 (Fraipont *et al.*, 2011). Néanmoins, une étude récente réalisée au laboratoire propose que toutes ces protéines forment un seul et même complexe, régulé par une sérine/thréonine-kinase, afin d'assurer la synthèse du peptidoglycane nécessaire à l'élongation (synthèse périphérique) et à la division (synthèse septale) du pneumocoque (Fleurie *et al.*, 2014a) (**Fig. 23**).

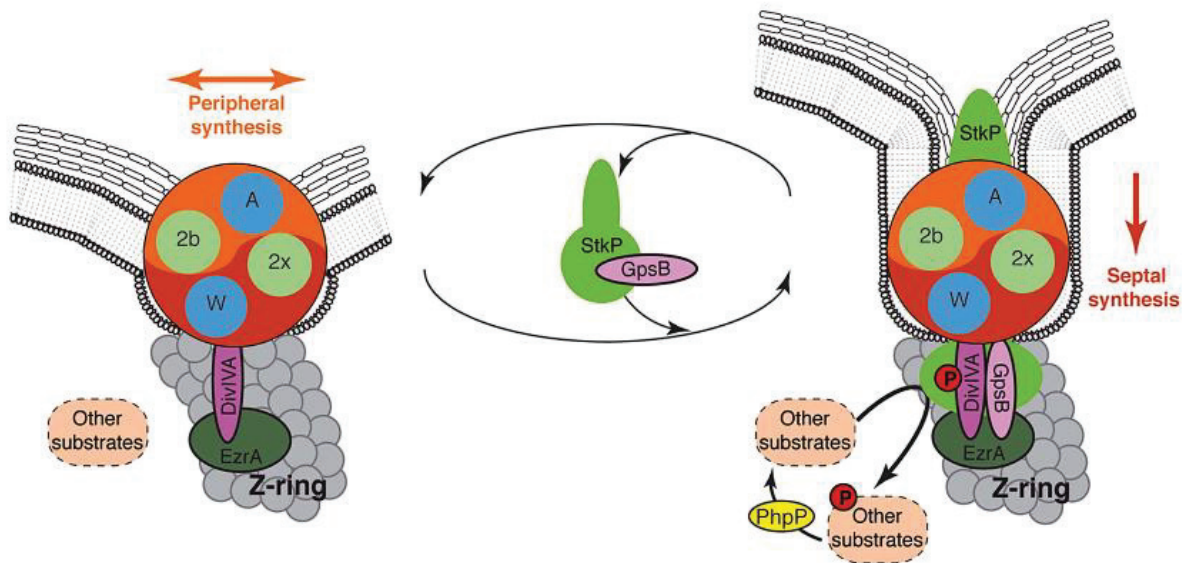


Figure 23 : Modèle de la machinerie de synthèse du peptidoglycane chez *S. pneumoniae*

Dans ce modèle, un large complexe d'assemblage du PG (Yin-Yang) contient chacune des machineries septale (rouge) et périphérique (orange). Les deux transpeptidases PBP2X et PBP2b (notées 2x et 2b) et les deux flippases FtsW et RodA (notées W et A) sont respectivement indiquées en vert et en bleu. La forme non-phosphorylée de DivIVA et des autres substrats de StkP est requise pour la synthèse périphérique de peptidoglycane et donc l'élongation de la cellule. GpsB n'intervient pas directement dans la synthèse de la paroi cellulaire mais est nécessaire à la localisation septale de StkP conduisant à la phosphorylation des substrats de StkP dont DivIVA et permettant la synthèse septale de PG. EzrA connecterait le complexe d'assemblage du PG *via* DivIVA et GpsB à l'anneau de FtsZ (gris). L'activité kinase de StkP est contrebalancée par la phosphatase PhpP modulant ainsi la fonction de diverses protéines (ovales en pointillé) dont DivIVA. La triade StkP/DivIVA/GpsB permettrait donc de synchroniser les synthèses périphériques et septales de PG. D'après Fleurie *et al.*, 2014a

III.1.ii La constriction du septum

La protéine de division reconnue comme étant la première à se localiser au futur septum bactérien est la protéine de type tubuline hautement conservée chez les bactéries, FtsZ (« Filamentous Temperature-Sensitive Z »). Cette protéine joue un rôle central dans la progression et la régulation de la division bactérienne (Margolin, 2000). FtsZ est une GTPase

ayant la capacité de se polymériser pour former un anneau au site de division de la cellule (Li *et al.*, 2007). Cet anneau est constitué de filaments d'oligomère de FtsZ pouvant adopter différents degrés de courbure selon que cette dernière est liée à une molécule de GTP ou à une molécule de GDP. En effet, il est proposé que lorsque FtsZ lie le GTP, elle forme des filaments droits ou faiblement courbés alors que lorsqu'elle fixe le GDP, les filaments formés sont fortement courbés (Lu *et al.*, 2000 ; Mingorance *et al.*, 2005). Ainsi, l'hypothèse que l'hydrolyse du GTP soit à l'origine de la force de constriction induisant la séparation des deux cellules filles a récemment été proposée (Erickson *et al.*, 2010). Plusieurs études ont montré que le cycle de vie de l'anneau de FtsZ pouvait être divisé en deux étapes : l'assemblage au milieu de la cellule et le désassemblage de cet anneau. L'assemblage et le désassemblage de FtsZ peuvent se produire très rapidement (moins d'une minute) (Sun et Margolin, 1998 ; Rueda *et al.*, 2003). Entre ces deux étapes, l'anneau de FtsZ persiste au milieu de la cellule pendant une grande partie du cycle cellulaire afin d'assurer la constriction cellulaire (Aarsman *et al.*, 2005). Il a été montré que cet anneau formait une structure très dynamique (Anderson *et al.*, 2004). De plus, l'essor des techniques de microscopie a permis d'observer que l'anneau de FtsZ serait discontinu et qu'il pourrait se comporter comme un ressort. Ainsi, la constriction du septum pourrait être le résultat d'une condensation de cet anneau (Strauss *et al.*, 2012).

La formation de l'anneau de FtsZ requiert la présence d'autres protéines, dites régulatrices, présentes au sein du divisome. Parmi celles-ci, on peut citer un premier régulateur majeur de FtsZ, FtsA. Cette protéine, également capable de recruter des protéines tardives de la division, forme un anneau se localisant au septum de la bactérie en même temps que FtsZ (Rueda *et al.*, 2003 ; Lara *et al.*, 2005, Beilharz *et al.*, 2012). Une hélice amphipathique présente à son extrémité C-terminale permet son ancrage à la membrane et par conséquent celui de FtsZ par interaction directe avec son domaine N-terminal (Pichoff et Lutkenhaus, 2005). Chez *B. subtilis*, il a été montré que cette protéine interagissait avec FtsZ avant même la formation de l'anneau de FtsZ (Jensen *et al.*, 2005). L'anneau de FtsZ serait alors un anneau hétérogène du complexe FtsA-FtsZ. Néanmoins, même si un mutant déficient pour l'expression de FtsA est fortement affecté dans sa capacité à former un anneau de FtsZ, ce dernier est toujours observé dans un faible nombre de cellules (Jensen *et al.*, 2005). Cette observation illustre bien la complexité des mécanismes contribuant à la stabilisation de l'anneau de FtsZ et suggère que d'autres protéines seraient également impliquées. C'est notamment le cas de la protéine SepF, chez *B. subtilis*, dont la surexpression complémente la délétion de FtsA (Ishikawa *et al.*, 2006).

A l'inverse de FtsA, la localisation septale de SepF est dépendante de FtsZ (Hamoen *et al.*, 2006). Elle forme un complexe stable avec FtsZ et est distribuée uniformément tout le long du protofilament de FtsZ (Singh *et al.*, 2008). Cette protéine polymérise en de très larges anneaux et est aussi abondante que FtsZ. D'après ces observations, il a été suggéré que SepF aurait un rôle dans l'organisation structurale de l'anneau de FtsZ (Gundogdu *et al.*, 2011).

Enfin, la formation de l'anneau de FtsZ est également régulée de façon négative par différentes protéines. C'est notamment le cas d'EzrA (« Extra Z Rings A ») qui est une protéine ancrée à la membrane. Elle est distribuée tout autour de la bactérie mais localise au site de division après la formation de l'anneau de FtsZ (Levin *et al.*, 1999). EzrA interagit avec FtsZ et inhibe sa polymérisation (Haeusser *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter que si EzrA est capable de bloquer la polymérisation de l'anneau de FtsZ, elle ne déstabilise pas les polymères de FtsZ préassemblés et favorise même leur persistance. Cette observation explique pourquoi ces deux protéines sont capables d'être co-localisées après la formation de l'anneau de FtsZ. EzrA pourrait également avoir un rôle dans le recrutement de PBPs au site de division (Claessen *et al.*, 2008 ; Fleurie *et al.*, 2014) (**Fig. 23**). Ainsi, cette protéine interviendrait dans le contrôle de l'élongation et de la division bactérienne. Chez *S. pneumoniae*, EzrA maintiendrait une dynamique d'assemblage de FtsZ au septum et coordonnerait la croissance et la division bactérienne (Fleurie *et al.*, 2014a).

III.1.iii La séparation des cellules filles

Lors des étapes tardives de la division cellulaire, il est nécessaire de cliver le peptidoglycane formé pour séparer les deux cellules filles. Ce clivage est réalisé par des hydrolases spécifiques des liaisons du peptidoglycane. Chez les bactéries à Gram-négatif, le clivage du peptidoglycane a lieu en parallèle de sa synthèse alors que chez les bactéries à Gram-positif le clivage a lieu après la formation du septum. Chez le pneumocoque, onze hydrolases potentielles ont été identifiées. Il a été observé que la délétion individuelle de cinq d'entre elles conduisait à des défauts de division et de morphologie (DacA, DacB, Pmp23 et PcsB) et/ou à la formation de longues chaînes (LytB et PcsB) (Barendt *et al.*, 2011). Ces protéines ont donc un rôle dans la synthèse et/ou le clivage du peptidoglycane septal. Il a récemment été montré que

l'une de ces hydrolases, PcsB, interagissait avec le complexe FtsEX (Sham *et al.*, 2011). Ce complexe est connu pour déclencher la sporulation de *B. subtilis* via une cascade de phosphorylation (Garti-Levi *et al.*, 2008). Le pneumocoque n'étant pas capable de sporuler, la fonction de ce complexe doit être différente chez cette bactérie. La déplétion de FtsX conduit au même phénotype que celui obtenu lors de la délétion de PcsB (Barendt *et al.*, 2009 ; Sham *et al.*, 2011). De plus, FtsX est nécessaire à la localisation septale de PcsB. Ces observations suggèrent que l'interaction entre ces deux protéines permettrait de coupler le remodelage du peptidoglycane à la séparation des deux cellules (Sham *et al.*, 2011). Il a également été proposé que le complexe FtsEX-PcsB soit à l'origine d'un signal permettant l'activation de LytA, l'autolysine majeure du pneumocoque, lorsque les bactéries entrent en phase stationnaire (Sham *et al.*, 2013).

Parmi les protéines intervenant dans la séparation des deux cellules filles, on peut également citer FtsK. Cette protéine intervient dans les étapes finales de la ségrégation des chromosomes (Liu *et al.*, 1998). En effet, cette protéine serait nécessaire au déplacement de l'ADN dans les cellules filles avant la fermeture du septum et la résolution des régions « ter » grâce à son activité ATPase (Stouf *et al.*, 2013 ; Aussel *et al.*, 2002). Il a également été montré que FtsK est requis pour la résolution des dimères de chromosomes formés lors de la recombinaison homologue entre les deux chromosomes fils (Le Bourgeois *et al.*, 2007).

III.2 Le positionnement du divisome

Pour conduire à l'obtention de deux cellules filles de taille identique, le positionnement du divisome au centre de la cellule est finement régulé par deux mécanismes majeurs, le système Min pour « Mini cells » (Barak *et al.*, 2007 ; Harry *et al.*, 2006) et le système Noc pour « Nucleoid Occlusion » (exclusion du nucléoïde) (Wu et Errington, 2004 ; 2011). De manière surprenante et remarquable, ces systèmes sont absents chez le pneumocoque. Ainsi, le positionnement du divisome chez le pneumocoque mettrait en œuvre un mécanisme complètement original propre aux *Streptococci* (Fleurie *et al.*, 2014b).

III.2.i Le système Min

Le système Min empêche la formation de septum au niveau des pôles de la bactérie et plus généralement ailleurs qu'au centre de la cellule (Lutkenhaus, 2007). Ce système est principalement constitué de trois protéines : MinC, MinD et MinE. MinC est une protéine antagoniste de l'assemblage de l'anneau de FtsZ (Hu et Lutkenhaus, 2000). Elle est activée et positionnée dans la cellule par le biais de son interaction avec une ATPase, MinD. Les mécanismes mis en place pour la localisation de MinD et le fonctionnement de ce système demeurent très discutés et semblent être différents d'une bactérie à l'autre.

Chez *E. coli*, ce système répond à un mécanisme de type oscillatoire (**Fig. 24A**). En effet, la forme dimérique de MinD, liée à l'ATP, interagit avec la membrane (Lackner *et al.*, 2003) tandis que sa forme monomérique, liée à l'ADP, diffuse librement dans le cytoplasme. Lorsqu'il est sous sa forme dimérique, MinD est capable de recruter MinC et d'inhiber la polymérisation de FtsZ. La fonction de MinE serait d'empêcher cette inhibition au centre de la bactérie. En effet, MinE existe également sous deux formes, l'une diffusant dans le cytoplasme et l'autre interagissant avec MinD et la membrane (Park *et al.*, 2011). Ainsi, MinE se lierait à MinD au niveau de la membrane, stimulerait l'activité ATPase de ce dernier qui deviendrait cytoplasmique et se déplacerait vers le pôle opposé. MinE reste alors associé à la membrane sous sa forme active et pourrait « sauter » sur un autre MinD lié à la membrane selon le modèle de « Tarzan » (Howard et Kruse, 2005).

Chez *B. subtilis*, les mécanismes mis en place semblent être bien différents (**Fig. 24B**). En effet, la protéine MinE est absente et il semblerait que cette bactérie utilise la protéine DivIVA qui reconnaît la courbure formée par le septum naissant afin de localiser MinD (Eswaramoorthy *et al.*, 2011). En effet, en absence de DivIVA, le système Min se délocalise et bloque la division sur toute la longueur de la bactérie entraînant ainsi la formation de cellules filamenteuses. Il a également été observé que DivIVA forme un anneau de chaque côté du septum en formation et recrute la protéine MinJ responsable du recrutement en cascade de MinD puis MinC. Cette dernière bloque la polymérisation de l'anneau de FtsZ (Patrick et Kearns, 2008 ; Bramkamp *et al.*, 2008). Dans ce cas, le système Min empêche la formation d'un nouvel anneau de FtsZ immédiatement à côté de celui en cours de constriction (Gregory *et al.*, 2008) (**Fig. 24B**). On peut également noter que, chez *B. subtilis*, la fixation de MinD à la membrane

n'est pas dépendante de sa fixation à l'ATP (Marston et Errington, 1999). Ainsi, le rôle de cette fixation ne serait pas de permettre l'interaction de MinD avec la membrane mais de réguler son interaction avec ses différents partenaires. De plus, cette fixation de l'ATP permet aussi le recrutement de MinC. Cependant, les mécanismes régulant l'activité ATPase de MinD demeurent largement méconnus de nos jours.

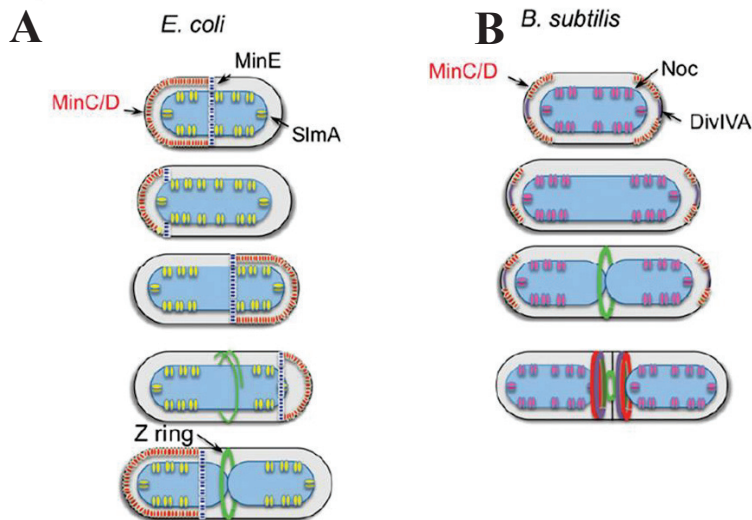


Figure 24 : Régulation spatiale de l'assemblage de l'anneau FtsZ par les différents antagonistes de FtsZ chez *E. coli* (A) et *B. subtilis* (B)

(A) L'exclusion du nucléoïde est réalisée par SlmA chez *E. coli* (Noc chez *B. subtilis*) et empêche la formation de l'anneau de FtsZ en présence d'ADN. Le système Min empêche la formation de cet anneau à proximité des pôles. MinC est activée par son recrutement à la membrane par MinD et oscille entre les pôles cellulaires sous le contrôle de MinD et de MinE. (B) Chez *B. subtilis*, MinC et MinD sont recrutés au niveau du septum en formation par l'intermédiaire de MinJ et DivIVA. D'après Lutkenhaus *et al.*, 2012

III.2.ii Le système Noc

Le système Noc permet de protéger l'ADN lors de la fermeture septale. En effet, si la division se termine avant que les chromosomes soient correctement ségrégués, un effet « guillotine » aurait lieu et les deux cellules filles n'hériteraient pas de l'intégralité du chromosome. Ainsi, ce système empêche la constriction de l'anneau de FtsZ au niveau des régions riches en ADN (Mulder et Woldringh, 1989). Le mécanisme moléculaire de ce système est longtemps resté obscur jusqu'à l'identification de deux protéines différentes mais ayant un rôle d'exclusion du nucléoïde : Noc chez *B. subtilis* (Wu et Errington, 2004) et SlmA chez *E. coli*

(Bernhardt et de Boer, 2005). Ces protéines se lient à des séquences d'ADN spécifiques retrouvées tout le long du chromosome sauf au niveau de la région *ter* (Wu *et al.*, 2009, Cho *et al.*, 2011, Tonthat *et al.*, 2011). Avant que la réplication de l'ADN ne soit initiée, la région médiale de la bactérie est occupée par la région du chromosome contenant l'origine de réplication (*oriC*) protégée par les protéines du système Noc. Ainsi, la protéine FtsZ est incapable de polymériser à cet endroit. Une fois que la réplication a débuté, les zones proches de l'*oriC* et les protéines associées migrent en direction des pôles. Lorsque le chromosome protégé par les protéines du système Noc est complètement ségrégué, une zone sans protection apparaît au centre de la bactérie permettant la formation de l'anneau de FtsZ (Lutkenhaus, 2007) (**Fig. 24B**). Ainsi, ce système n'a pas seulement un rôle dans le contrôle du positionnement de FtsZ au centre de la cellule mais également dans la coordination de la division cellulaire et de la ségrégation des chromosomes.

III.2.iii Autres systèmes

Plusieurs espèces, dont *C. crescentus*, *M. xanthus* et *S. pneumoniae*, sont dépourvues d'homologues des protéines Min, SlmA ou Noc. Ainsi, ces organismes ont développé différents systèmes conduisant au positionnement correct de l'anneau de FtsZ. Chez *C. crescentus*, la polymérisation de FtsZ est dépendante de la protéine MipZ (Thanbichler et Shapiro, 2006). La dimérisation de cette protéine lui permet d'interagir avec l'ADN sur des séquences non spécifiques et est promue par ParB, une protéine impliquée dans la ségrégation du chromosome. Dans cet organisme, ParB est ancrée au pôle par le biais de son interaction avec la protéine PopZ et se lie à des séquences chromosomiques proches de l'*oriC*. Ainsi, ParB promeut la dimérisation de MipZ à proximité de l'*oriC*. Ce processus crée un gradient de MipZ dans lequel la plus grande concentration est au niveau des pôles de la bactérie et la plus faible se trouve au milieu de la cellule. Cette plus faible concentration offre donc une zone favorable à la formation de l'anneau de FtsZ (Kiekebusch *et al.*, 2012 ; Lutkenhaus *et al.*, 2012). Chez *M. xanthus* et *S. pneumoniae*, les mécanismes mis en place semblent différents. En effet, ces organismes possèdent une protéine permettant le recrutement direct de FtsZ au site de division. Ces protéines sont respectivement PomZ (Treuner-Lange *et al.*, 2013) et MapZ (Fleurie *et al.*, 2014b). Ces observations montrent qu'il existe différents mécanismes permettant le positionnement du divisome au centre de la

bactérie. Il peut être supposé que ces mécanismes permettent de satisfaire différentes nécessités liées aux modes de vie, à la morphologie ou encore aux stades de développement des bactéries.

III.3 La ségrégation du chromosome

De nombreuses études récentes réalisées chez différentes bactéries ont montré que la ségrégation du chromosome était un processus composé d'étapes multiples initiées par la ségrégation des origines de réplifications de l'ADN chromosomique immédiatement après leur duplication (Shebelut *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2013). Il est aujourd'hui reconnu que le système ParABS pourrait contrôler ce transport actif de l'origine de réplification de l'ADN chromosomique.

Le système ParABS a tout d'abord été identifié pour son rôle dans la ségrégation et l'héritage de l'information génétique d'origine plasmidique (Austin et Abeles, 1983). Il est caractérisé par la présence d'une séquence d'ADN, *parS*, une protéine fixant l'ADN, ParB et une protéine dérivant des ATPases de type Walker A, ParA (Ebersbach et Gerdes, 2005). ParB reconnaît de façon spécifique les séquences *parS* qui sont retrouvées à proximité de l'origine de réplification de plusieurs chromosomes bactériens (Livny *et al.*, 2007) (**Fig. 25**). Une fois liée à *parS*, il a été proposé que ParB puisse se répandre sur les séquences flanquantes afin de former le complexe de ségrégation ParB/*parS* (Murray *et al.*, 2006 ; Breier et Grossman, 2007). De son côté, ParA se dimérise après avoir fixé l'ATP. Cette dimérisation lui permet d'interagir de manière aspécifique avec l'ADN (Leonard *et al.*, 2005 ; Hester et Lutkenhaus, 2007). ParA, seule, possède une faible activité ATPasique qui est stimulée par l'interaction entre le dimère de ParA sur l'ADN et ParB (Easter et Gober, 2002 ; Leonard *et al.*, 2005 ; Scholefield *et al.*, 2011). Malgré la conservation de ces différentes propriétés biochimiques, le rôle cellulaire du système ParABS reste partiellement incompris et semble être spécifique à chaque espèce bactérienne.

Un modèle du rôle de ParA et ParB a, par exemple, été proposé chez *C. crescentus*, pour qui ParA et ParB sont essentielles à sa viabilité (Mohl et Gober, 1997). Le complexe de ségrégation ParB/*parS* se situe au vieux pôle cellulaire à proximité de l'origine de réplification alors que la région *ter* de la réplification chromosomique se situe à l'opposé, au nouveau pôle (Jensen et Shapiro, 1999) (**Fig. 25**). Il a été montré qu'avant la réplification de l'ADN, ParA se

localise sous la forme de nuages s'étendant du nouveau pôle au milieu de la cellule. La réplication des origines de réplication conduit à la formation de deux complexes ParB/*parS* séparés. Le complexe le plus proche du vieux pôle reste en place alors que le second migre jusqu'au nouveau pôle en utilisant le lien formé par les nuages de ParA. Ces nuages disparaissent au fur et à mesure de la migration du complexe comme si le retrait de ParA permettait de tirer le complexe ParB/*parS* d'un pôle à l'autre (Ptacin *et al.*, 2010 ; Schofield *et al.*, 2010 ; Shebelut *et al.*, 2010). Ces observations renforcent l'idée du modèle dit « en fuseau » dans lequel ParA polymériserait en un fin filament après avoir fixé l'ATP. La dépolymérisation de ce filament, due à la stimulation de l'activité ATPasique de ParA médiée par ParB, permettrait donc de tirer le complexe ParB/*parS* et l'origine de réplication associée.

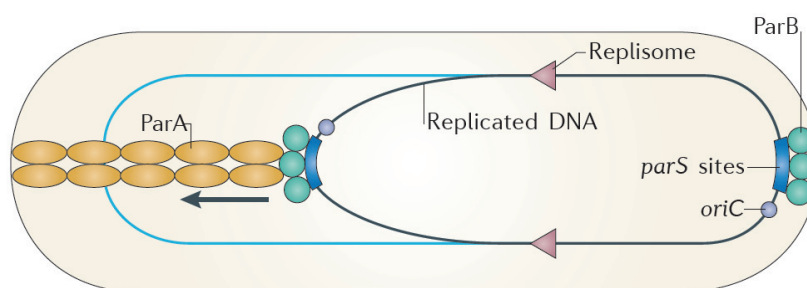


Figure 25 : Schéma de la ségrégation du chromosome chez *C. crescentus*

ParB se lie aux séquences *parS* localisées à proximité de l'origine de réplication (*oriC*). Peu de temps après l'initiation de la réplication, ParB se lie aux sites *parS* nouvellement dupliqués et interagit avec le filament formé par les dimères de ParA. La dépolymérisation de ce filament conduit alors à la ségrégation du chromosome nouvellement synthétisé. D'après Lindas et Bernander, 2013.

Autre exemple intéressant chez *B. subtilis* dans lequel les orthologues de ParA et ParB, respectivement Soj et SpoOJ, interviennent dans la régulation de la réplication de l'ADN dans les cellules végétatives (Murray et Errington, 2008) alors qu'elles interviennent dans le partitionnement du chromosome lors de la sporulation (Ireton *et al.*, 1994 ; Sharpe et Errington, 1996 ; Wu et Errington, 2003 ; Lee et Grossman, 2006). De la même manière que ParB et ParA, SpoOJ interagit avec les séquences *parS* à proximité de l'origine de réplication du chromosome (Lin *et al.*, 1997 ; Lin et Grossman, 1998 ; Murray *et al.*, 2006) et Soj forme des dimères ATP-dépendants capable de fixer l'ADN *in vitro* (Schofield *et al.*, 2011).

Une étude récente, combinant ces résultats d'expériences biochimiques et de biologie cellulaire à des modèles mathématiques, propose un mécanisme complémentaire de régulation

dans lequel la dynamique chromosomique et la capacité à hydrolyser l'ATP sont essentielles à la translocation ParA-dépendante du complexe ParB/*parS* (Lim *et al.*, 2014). En effet, les auteurs proposent un modèle basé sur l'élasticité intrinsèque du chromosome. Ce modèle suggère que le dimère de ParA liant l'ATP a pour rôle de connecter le complexe de ségrégation ParB/*parS* à la dynamique intrinsèque de l'ADN. En effet, ce serait l'élasticité du chromosome qui permettrait le déplacement du complexe ParB/*parS* en direction de l'endroit où la concentration en ParA liée à l'ADN est la plus élevée. (Lim *et al.*, 2014).

En plus de leur rôle dans la ségrégation des chromosomes, des protéines homologues à ParA sont impliquées dans le positionnement d'autres composants cellulaires tels que des micro-compartiments métaboliques ou des clusters du chimiotactisme (Savage *et al.*, 2010 ; Ringgaard *et al.*, 2011 ; Roberts *et al.*, 2012). Ces observations mettent en lumière la versatilité du système ParABS.

III.4 Autres protéines importantes

Parmi les protéines importantes de la division des bactéries à Gram-positif, certaines ont été particulièrement étudiées. On retrouve notamment la protéine DivIVA. Cette protéine est capable de se fixer à la membrane plasmique *via* son domaine N-terminal. Elle est capable d'interagir avec elle-même ainsi qu'avec de nombreuses protéines de la division (Fadda *et al.*, 2003). DivIVA se localise aux pôles et au septum de la bactérie. Des fonctions diverses ont été proposées pour cette protéine. Ainsi, chez *B. subtilis*, elle serait impliquée dans le positionnement de l'anneau de FtsZ (cf. § III.2.i) (Barak *et al.*, 2007). Elle serait aussi impliquée dans la ségrégation des chromosomes pendant la sporulation de cette bactérie en retenant, aux pôles cellulaires, l'origine de réplication du chromosome et les protéines impliquées dans la sporulation telles que RacA, SpoOJ et Soj (Wu et Errington, 2003 ; Ben-Yehuda *et al.*, 2003). Chez *Listeria monocytogenes*, il a été démontré que cette protéine pouvait intervenir dans la formation de biofilm et la virulence (Halbedel *et al.*, 2012) alors qu'elle serait essentielle à la croissance polaire, la morphogénèse et la ségrégation des chromosomes chez les actinobactéries (Letek *et al.*, 2008 ; Ginda *et al.*, 2013). Chez le pneumocoque, son inactivation entraîne la formation de chaînes de cellules arrondies, parfois anucléées et possédant des septa incomplets (Fadda *et al.*, 2003). Il a été proposé que DivIVA soit emmenée au septum après FtsZ et qu'elle permette le

recrutement des protéines tardives du divisome comme les hydrolases du peptidoglycane (PcsB et LytB) et les enzymes de synthèse du peptidoglycane nécessaires à la formation et à la fermeture du septum (Fadda *et al.*, 2007 ; Vicente et Garcia-Ovalle, 2007). Des travaux réalisés au sein de notre équipe ont récemment montré que, chez le pneumocoque, DivIVA était phosphorylée *in vivo* par la sérine/thréonine-kinase StkP (Fleurie *et al.*, 2012). Ces travaux ont permis de montrer qu'en absence de phosphorylation de DivIVA les cellules s'allongent et présentent des excroissances polaires dans un certain nombre de cas. Ces observations permettent de proposer que la phosphorylation de DivIVA contribuerait à favoriser la production de peptidoglycane nécessaire à la septation aux dépens d'une synthèse de peptidoglycane responsable de l'élongation des cellules qui, elle, est favorisée par la forme non phosphorylée de DivIVA. Ce mécanisme permettrait donc d'assurer et de maintenir la forme de la bactérie.

Chez les bactéries à Gram-positif, on retrouve également une protéine paralogue de DivIVA, GpsB (« guiding PBP1 shuttling »). Le domaine N-terminal de GpsB présente une forte similarité de séquence avec DivIVA (Tavares *et al.*, 2008) et est indispensable à la localisation septale de cette protéine. Tout comme DivIVA, le recrutement septal de cette protéine se fait bien après la formation de l'anneau de FtsZ (Tavares *et al.*, 2008). Il a également été observé que chez *B. subtilis*, GpsB est requise pour la division des cellules dans lesquelles FtsA est absente. Ainsi, il semblerait que ces deux protéines aient un rôle commun bien que GpsB ne soit pas capable d'agir comme un régulateur positif de la polymérisation de FtsZ (Tavares *et al.*, 2008). Dans une autre étude, il a été observé que l'absence cumulée de GpsB et de EzrA conduisait à une excroissance polaire des bactéries ainsi qu'à une délocalisation de la synthèse du peptidoglycane (Claessen *et al.*, 2008). En effet, la synthèse septale de peptidoglycane est affectée dans ces souches. Cette observation suggère que GpsB et EzrA participent au recrutement et/ou à l'activation de protéines impliquées dans cette synthèse septale. Par double-hybride bactérien, il a été montré que GpsB était également capable d'interagir avec PBP1, une PBP ayant la particularité d'être à la fois présente au site de synthèse du peptidoglycane septal et périphérique. De plus, la localisation de cette PBP est également perturbée en absence de GpsB et d'EzrA. Au vu de ces résultats, un modèle dans lequel EzrA et GpsB interviendraient dans la localisation au site de division ou d'élongation de protéines de réticulation du peptidoglycane (PBP1) a été proposé (Claessen *et al.*, 2008) (**Fig. 26**).

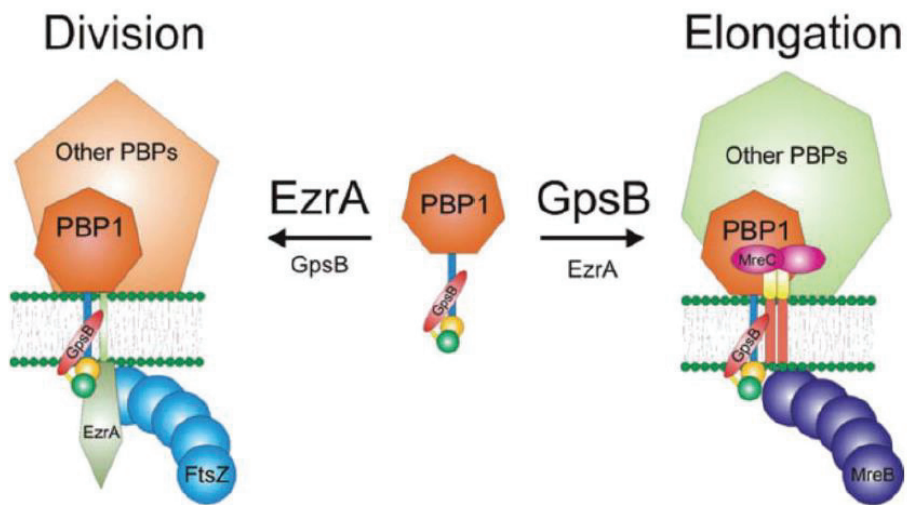


Figure 26 : Rôle de EzrA et de GpsB dans la localisation de PBP1 aux sites de synthèse septale au périphérique de peptidoglycane chez *B. subtilis*

GpsB, présente à la fois dans la machinerie de synthèse septale (division) et latérale (élongation), permettrait à PBP1 de se localiser soit au site de division soit au site d'élongation. D'après Claessen *et al.*, 2008

Chez *S. pneumoniae*, il a récemment été montré que GpsB était indispensable à la localisation de StkP et, par conséquent, à la phosphorylation des substrats de StkP parmi lesquels on retrouve DivIVA. Ainsi, il a été proposé que GpsB agirait comme un régulateur négatif de DivIVA et favoriserait la synthèse septale de peptidoglycane (Fleurie *et al.*, 2014a) (**Fig. 23**).

**Etude du rôle de l'autophosphorylation de la
tyrosine-kinase bactérienne CpsD dans la
coordination de la synthèse de la capsule
polysaccharidique et la division cellulaire
chez *Streptococcus pneumoniae***

I Matériels et méthodes

I.1 Cultures bactériennes

I.1.i Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches bactériennes utilisées sont présentées dans le tableau 3.

Souches	Génotypes	Phénotypes	Origines
<i>Escherichia coli</i>			
XL1-Blue	<i>supE44 ; hsdR17 ; recA1 ; endA1 ; gyrA46 ; thi ; relA1 ; lac⁻ ; [proAB⁺ lac^f lacZΔM15 Tn10 (tet^R)]</i>	Tet ^R	Bullock <i>et al.</i> , 1987
AD494 (DE3)	<i>Δara-leu7697 ; ΔlacX74 ; ΔphoAPvullI phoR ; ΔmalF3 ; F'[lac⁺(lac^f) proj] ; trxB::kan (DE3)</i>	Kan ^R	Novagen [®]
EC1000 pHK096- <i>rfp-stkP</i>	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu) 7697 galU galK λ⁻ rpsL (Str^R) nupG ; pHK096-<i>rfp-stkP</i></i>	Str ^R /Amp ^R	MGG, Université de Groningen
XL1-Blue pCM83- <i>sfgfp</i>	<i>supE44 ; hsdR17 ; recA1 ; endA1 ; gyrA46 ; thi ; relA1 ; lac⁻ ; [proAB⁺ lac^f lacZΔM15 Tn10 (tet^R)] ; pCM83-<i>sfgfp</i></i>	Tet ^R /Amp ^R	IBS, UMR 5075, Grenoble
XL1-Blue pGBDU-C1- <i>cpsD</i>	<i>supE44 ; hsdR17 ; recA1 ; endA1 ; gyrA46 ; thi ; relA1 ; lac⁻ ; [proAB⁺ lac^f lacZΔM15 Tn10 (tet^R)] ; pGBDU-C1-<i>cpsD</i></i>	Tet ^R /Amp ^R	Cette étude
XL1-Blue pGAD-C1- <i>cpsC</i>	<i>supE44 ; hsdR17 ; recA1 ; endA1 ; gyrA46 ; thi ; relA1 ; lac⁻ ; [proAB⁺ lac^f lacZΔM15 Tn10 (tet^R)] ; pGADU-C1-<i>cpsC</i></i>	Tet ^R /Amp ^R	Cette étude
XL1-Blue pGAD-C1- <i>cpsCACTer</i>	<i>supE44 ; hsdR17 ; recA1 ; endA1 ; gyrA46 ; thi ; relA1 ; lac⁻ ; [proAB⁺ lac^f lacZΔM15 Tn10 (tet^R)] ; pGADU-C1-<i>cps cpsCACTer</i></i>	Tet ^R /Amp ^R	Cette étude
XL1-Blue pT7.7 <i>cpsD-gfp</i>	<i>supE44 ; hsdR17 ; recA1 ; endA1 ; gyrA46 ; thi ; relA1 ; lac⁻ ; [proAB⁺ lac^f lacZΔM15 Tn10 (tet^R)] ; pT7.7 <i>cpsD-gfp</i></i>	Tet ^R /Amp ^R	Cette étude
AD494 (DE3) pQE30- <i>cpsD</i> TIGR4	<i>Δara-leu7697 ; ΔlacX74 ; ΔphoAPvullI phoR ; ΔmalF3 ; F'[lac⁺(lac^f) proj] ; trxB::kan (DE3) ; pQE30-<i>cpsD</i> TIGR4</i>	Kan ^R / Amp ^R	Cette étude
AD494 (DE3) pQE30- <i>cpsC_{cyto}-cpsD</i> TIGR4	<i>Δara-leu7697 ; ΔlacX74 ; ΔphoAPvullI phoR ; ΔmalF3 ; F'[lac⁺(lac^f) proj] ; trxB::kan (DE3) ; pQE30-<i>cpsC_{cyto}-cpsD</i> TIGR4</i>	Kan ^R / Amp ^R	Cette étude
AD494 (DE3) pQE30- <i>cpsC_{cyto}-cpsD4YF</i> TIGR4	<i>Δara-leu7697 ; ΔlacX74 ; ΔphoAPvullI phoR ; ΔmalF3 ; F'[lac⁺(lac^f) proj] ; trxB::kan (DE3) ; pQE30-<i>cpsC_{cyto}-cpsD4YF</i> TIGR4</i>	Kan ^R / Amp ^R	Cette étude
AD494 (DE3) pQE30- <i>cpsC_{cyto}-cpsD4YE</i> TIGR4	<i>Δara-leu7697 ; ΔlacX74 ; ΔphoAPvullI phoR ; ΔmalF3 ; F'[lac⁺(lac^f) proj] ; trxB::kan (DE3) ; pQE30-<i>cpsC_{cyto}-cpsD4YE</i> TIGR4</i>	Kan ^R / Amp ^R	Cette étude
AD494 (DE3) pT7.7 <i>parB</i>	<i>Δara-leu7697 ; ΔlacX74 ; ΔphoAPvullI phoR ; ΔmalF3 ; F'[lac⁺(lac^f) proj] ; trxB::kan (DE3) ; pT7.7-<i>parB</i></i>	Kan ^R / Amp ^R	Cette étude

<i>Streptococcus pneumoniae</i>			
D39	<i>wt</i>	-	LMGM, UMR 5100, Toulouse
R1226	<i>rpsL::rpsL1 ; ΔcibABC::kan-rpsL</i>	Kan ^R /Str ^S	
R800 <i>ftsZ-kan-rpsL</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; ftsZ-kan-rpsL</i>	Str ^R	Fleurie <i>et al.</i> , 2014a
R800 <i>ftsZ-gfp</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; ftsZ-gfp</i>	Kan ^R /Str ^S	
D39 <i>rpsL1</i>	<i>rpsL::rpsL1</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD::kan-rpsL</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; ΔcpsD::kan-rpsL</i>	Kan ^R /Str ^S	Cette étude
D39 <i>ΔcpsD</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; ΔcpsD</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD3YE</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YE</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD3YF</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YF</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD-rfp</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD-rfp</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD3YE-rfp</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YE-rfp</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD3YF-rfp</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YF-rfp</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD-gfp</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD-gfp</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD-6His</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD-6His</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD3YE-6His</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YE-6His</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD3YF-6His</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YF-6His</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsC::kan-rpsL</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; ΔcpsC::kan-rpsL</i>	Kan ^R /Str ^S	Cette étude
D39 <i>cpsCΔCter</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsCΔCter</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsC::kan-rpsL</i> <i>cpsD-gfp</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; ΔcpsC::kan-rpsL ; cpsD-gfp</i>	Kan ^R /Str ^S	Cette étude
D39 <i>cpsCΔCter</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsCΔCter ; cpsD-gfp</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>parB-gfp-spc</i>	<i>parB-gfp-spc</i>	Spc ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD</i> <i>parB-gfp-spc</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD ; parB-gfp-spc</i>	Str ^R /Spc ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD3YE</i> <i>parB-gfp-spc</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YE ; parB-gfp-spc</i>	Str ^R /Spc ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD3YF</i> <i>parB-gfp-spc</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YF ; parB-gfp-spc</i>	Str ^R /Spc ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD-6His</i> <i>parB-gfp-spc</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD-6His ; parB-gfp-spc</i>	Str ^R /Spc ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD3YE-6His</i> <i>parB-gfp-spc</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YE-6His ; parB-gfp-spc</i>	Str ^R /Spc ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD3YF-6His</i> <i>parB-gfp-spc</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YF-6His ; parB-gfp-spc</i>	Str ^R /Spc ^R	Cette étude
D39 <i>ftsZ-kan-rpsL</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; ftsZ-kan-rpsL</i>	Kan ^R /Str ^S	Cette étude
D39 <i>ftsZ-gfp</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; ftsZ-gfp</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD3YE</i> <i>ftsZ-kan-rpsL</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YE ; ftsZ-kan-rpsL</i>	Kan ^R /Str ^S	Cette étude
D39 <i>cpsD3YE</i> <i>ftsZ-gfp</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YE ; ftsZ-gfp</i>	Str ^R	Cette étude

D39 <i>cpsD3YF</i> <i>ftsZ-kan-rpsL</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YF ; ftsZ-kan-rpsL</i>	Kan ^R /Str ^S	Cette étude
D39 <i>cpsD3YF</i> <i>ftsZ-gfp</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YF ; ftsZ-gfp</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsH-kan-rpsL</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsH-kan-rpsL</i>	Kan ^R /Str ^S	Cette étude
D39 <i>cpsH-sfgfp</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsH-sfgfp</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>ΔcpsD</i> <i>cpsH-kan-rpsL</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; ΔcpsD ; cpsH-kan-rpsL</i>	Kan ^R /Str ^S	Cette étude
D39 <i>ΔcpsD</i> <i>cpsH-sfgfp</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; ΔcpsD ; cpsH-sfgfp</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsCACter</i> <i>cpsH-kan-rpsL</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsCACter ; cpsH-kan-rpsL</i>	Kan ^R /Str ^S	Cette étude
D39 <i>cpsCACter</i> <i>cpsH-sfgfp</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsCACter ; cpsH-sfgfp</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD3YE</i> <i>cpsH-kan-rpsL</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YE ; cpsH-kan-rpsL</i>	Kan ^R /Str ^S	Cette étude
D39 <i>cpsD3YE</i> <i>cpsH-sfgfp</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YE ; cpsH-sfgfp</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD3YF</i> <i>cpsH-kan-rpsL</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YF ; cpsH-kan-rpsL</i>	Kan ^R /Str ^S	Cette étude
D39 <i>cpsD3YF</i> <i>cpsH-sfgfp</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD3YF ; cpsH-sfgfp</i>	Str ^R	Cette étude
D39 <i>cpsD-rfp</i> <i>parB-gfp-spc</i>	<i>rpsL::rpsL1 ; cpsD-rfp ; parB-gfp-spc</i>	Str ^R /Sp ^R	Cette étude

Tableau 3 : Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

Les souches d'*E. coli* sont cultivées en milieu liquide de Luria-Bertani (LB) à 37 °C sous agitation en présence des antibiotiques appropriés. La croissance de cette souche est suivie par mesure de son absorbance à 600 nm (Abs₆₀₀). Les antibiotiques sont utilisés aux concentrations finales suivantes : 100 µg/mL pour l'ampicilline, 15 µg/mL pour la tétracycline et 25 µg/mL pour la kanamycine.

Les souches de *S. pneumoniae* utilisées sont des dérivés de la souche D39 de sérotype 2. Ces souches sont cultivées en milieu complet de Todd-Hewitt additionné d'extraits de levure (THY) à 37 °C. Leur croissance est suivie par mesure de leur absorbance à 550 nm (Abs₅₅₀). Les antibiotiques sont utilisés aux concentrations finales suivantes : 250 µg/mL pour la kanamycine, 200 µg/mL pour la streptomycine et 100 µg/mL pour la spectinomycine.

I.1.ii Courbes de croissance du pneumocoque

Une culture de 15 mL des souches d'intérêts de pneumocoque est effectuée à 37 °C jusqu'à une Abs₅₅₀ comprise entre 0,1 et 0,3. 4 mL de THY sont déposés dans des cuves de spectrophotomètre de 4,5 mL etensemencés à une Abs₅₅₀ de 0.001. L'absorbance de ces cultures est alors mesurée toutes les 10 min pendant 12 h à l'aide d'un spectrophotomètre Jasco V630 Bio[®] tempéré à 37 °C.

I.2 Techniques de biologie moléculaire

I.2.i Purification de plasmides

Les préparations d'ADN plasmidique sont réalisées à l'aide du kit « nucleospin plasmid[®] » distribué par la société Macherey-Nagel[®]. L'ADN plasmidique est élué dans du tampon Tris-HCl 5 mM à pH 8,5 et conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation.

I.2.ii Amplification d'un fragment d'ADN

Le mélange réactionnel suivant est préparé :

ADN matriciel	0,1 à 10 ng
Amorces nucléotidiques	500 nM chacune
Tampon de PCR 10X	5 µL
dXTP	100 pM
Polymérase à ADN	2.5 U
H ₂ O	qsp 50 µL

L'amplification du fragment d'intérêt se fait de manière exponentielle par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Cette réaction en chaîne est automatisée (MJ Mini[®] de Biorad[®]) et consiste en la répétition de 28 cycles se déroulant en trois temps :

- Dénaturation de l'ADN matriciel (d'origine plasmidique ou génomique) à 94 °C
- Hybridation des deux amorces oligonucléotidiques, spécifiques des extrémités 5' et 3' du fragment d'ADN à amplifier (**Tab. 4**), à une température propre aux amorces utilisées.

- Elongation à 72 °C par l'ADN polymérase. La durée de l'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier et de la nature de l'ADN polymérase utilisée. Dans le cas de la Phusion[®], la vitesse de polymérisation est de 2 kb/min.

Amorces*	Séquences 5'-3'	Utilisations
Double-hybride en système levure		
EcoRI <i>cpsC</i> (+)	TATGAATTCAAAGAACAAAACACGATAGAAATC	Amplification de <i>cpsC</i> . La séquence en vert correspond à la séquence consensus reconnue par EcoRI.
PstI <i>cpsC</i> (-)	TATCTGCAGCTATTTTCATTTTGTCCAAATCTGG	Amplification de <i>cpsC</i> . La séquence en vert correspond à la séquence consensus reconnue par PstI.
PstI <i>cpsCΔCter</i> (-)	TATCTGCAGTTACAACCTCAATCAAAA GAACAGC	Amplification de <i>cpsCΔCter</i> . La séquence en vert correspond à la séquence consensus reconnue par PstI.
EcoRI <i>cpsD</i> (+)	TATGAATTCCTCAACGTTAGAAATCTCACAGGCA	Amplification de <i>cpsD</i> . La séquence en vert correspond à la séquence consensus reconnue par EcoRI.
PstI <i>cpsD</i> (-)	TATCTGCAGCTATTTTTTATTTTTCCC GTAATC	Amplification de <i>cpsD</i> . La séquence en vert correspond à la séquence consensus reconnue par PstI.
Surproduction de protéines		
NdeI <i>cpsD</i> D39 (+)	TATCATATGCCAACGTTAGAAATCTCACAGGCA	Expression de CpsD de D39 fusionnée à la GFP. La séquence en vert correspond à la séquence consensus reconnue par NdeI.
HindIII <i>gfp</i> D39 (-)	CCCAAGCTTATTTATACAATTCATCCATACC	Expression de CpsD de D39 fusionnée à la GFP. La séquence en vert correspond à la séquence consensus reconnue par HindIII.
BamHI <i>cpsD</i> TIGR4 (+)	TATGGATCCCGACATTAGAAATAGCACAAAAAAACTG	Amplification de CpsD de TIGR4. La séquence en vert correspond à la séquence consensus reconnue par BamHI.
HindIII <i>cpsD</i> TIGR4 (-)	TATAAGCTTTATTTTTTACCATAATTCCATAGG	Amplification de CpsD de TIGR4. La séquence en vert correspond à la séquence consensus reconnue par HindIII.
BamHI <i>cpsC_{cyto}</i> TIGR4 (+)	TATGGATCCCTTTGGATACTCGTGTGAAAC	Amplification de l'extrémité C-terminale de CpsC de TIGR4. La séquence en vert correspond à la séquence consensus reconnue par BamHI.
<i>cpsC_{cyto}</i> TIGR4 (-)	GTGCTATTTCTAATGTCGGCATTTTCAACTTACCCAAGTTTGG	Amplification de l'extrémité C-terminale de CpsC de TIGR4. La séquence en bleu est complémentaire de <i>cpsD</i> TIGR4 (+)
<i>cpsD</i> TIGR4 (+)	ATGCCGACATTAGAAATAGCAC	Amplification de CpsD de TIGR4 fusionnée à l'extrémité C-terminale de CpsC.
HindIII <i>cpsD4YF</i> TIGR4 (-)	CCCAAGCTTTATTTTTTACCAAAATT TCCAAGGAACCGAAAACCTCAAACT TATTAACCGAGATATCC	Amplification de CpsD de TIGR4. Les mutations des tyrosines du YC en phénylalanines sont en rouge. La séquence en vert correspond à la séquence consensus reconnue par HindIII.
HindIII <i>cpsD4YE</i> TIGR4 (-)	CCCAAGCTTTATTTTTTACCCTCATT TCCCTCGGAACCTCAACTCCCTCCT TATTAACCGAGATATCC	Amplification de CpsD de TIGR4. Les mutations des tyrosines du YC en acides glutamiques sont en rouge. La séquence en vert correspond à la séquence consensus reconnue par HindIII.
NdeI <i>parB</i> (+)	TATCATATGGAAAAATTTGAAATGATTTCTATC	Amplification de ParB de D39. La séquence en vert correspond à la séquence consensus reconnue par NdeI.
PstI <i>parB</i> (-)	TATCTGCAGTTTCAGGCTGTTGATAATTCTACT	Amplification de ParB de D39. La séquence en vert correspond à la séquence consensus reconnue par PstI.
Construction des mutants de <i>S. pneumoniae</i>		
SG143- <i>rpsL1</i> -up (+)	GTTACAATAATAGACGGTACTTTTTTAC	Amplification de <i>rpsL1</i>

SG144- <i>rpsL</i> -down (-)	CTTCAAGTGCATCGTTGCC	Amplification de <i>rpsL</i>
SG72- <i>kan-rpsL</i> -up (+)	CCGTTTGATTTTTAATGGATAATG	Amplification de la cassette Janus
SG73- <i>kan-rpsL</i> -down (-)	AGAGACCTGGGCCCTTCC	Amplification de la cassette Janus
JN1- <i>cpsD</i> -up (+)	TTGTGACAGGTGCGGGGGC	Amplification de la région en amont de <i>cpsD</i>
JN2- <i>cpsD</i> -down (-)	TCAGCCCTACCAATGCACCC	Amplification de la région en aval de <i>cpsD</i>
SG126- <i>cpsD</i> -up (-)	CATTATCCATTA AAAAATCAAACGGAA CTTCTCCTATTTTCATTTGTCC	Amplification de la région en amont de <i>cpsD</i> pour sa fusion à la cassette Janus. La séquence en bleu est complémentaire de SG72
SG127- <i>cpsD</i> -down (+)	GGAAAGGGGCC CAGGTCTCTGTCGG GGGATAGAGATGAATGG	Amplification de la région en aval de <i>cpsD</i> pour sa fusion à la cassette Janus. La séquence en bleu est complémentaire de SG73
JN3- <i>cpsD</i> -up (-)	CATTCATCTCTAT CCCCCGACAACCTT CCTCCTATTTTCATTTGTCC	Amplification de la région en amont de <i>cpsD</i> pour sa délétion "propre". La séquence en bleu est complémentaire de JN4
JN4- <i>cpsD</i> -down (+)	GTCGGGGGATAGAGATGAATG	Amplification de la région en aval de <i>cpsD</i> pour sa délétion "propre"
JN38- <i>cpsD</i> -down (+)	GGGAAAATAAAAAATAGGTCGGGG GATAG	Amplification de la région en aval de <i>cpsD</i> pour la mutation des tyrosines du YC
JN41- <i>cpsD3YE</i> -down (-)	CTATCCCCGACCTATTTTTATTTTT CCCC CTCATCTCC CTC AGAACC CTCTT TGTCTACTGAAG	Amplification de la région en amont de <i>cpsD</i> et de <i>cpsD</i> lui-même. Les mutations des tyrosines du YC en acides glutamiques sont en rouge. La séquence en bleu est complémentaire de JN38
JN37- <i>cpsD3YF</i> -down (-)	CTATCCCCGACCTATTTTTATTTTT CCCC AAATCTCCA AA GAACCG AA TT TGTCTACTGAAG	Amplification de la région en amont de <i>cpsD</i> et de <i>cpsD</i> lui-même. Les mutations des tyrosines du YC en phénylalanines sont en rouge. La séquence en bleu est complémentaire de JN38
Linker- <i>rfp</i> -up (+)	CTAGACATCGAGTTCCTGCAGATGAA ACATCTTACCGGTTCC	Amplification de <i>rfp</i> à partir du plasmide PHK096- <i>rfp-stkP</i> . La séquence en bleu correspond au linker séparant le gène d'intérêt et <i>rfp</i>
<i>rfp</i> -down (-)	CAATTTACTAGGCCAAATCACAATAAC	Amplification de <i>rfp</i> à partir du plasmide PHK096- <i>rfp-stkP</i>
JN31- <i>cpsD-xfp</i> -down (-)	CTGCAGGAACTCGATGTCTAGTTTT TTTTATTTTTCCCGTAATCTCCATAAG	Amplification de la région en amont de <i>cpsD</i> et de <i>cpsD</i> lui-même. La séquence en bleu est complémentaire du linker. Utilisée pour les fusions <i>rfp</i> et <i>gfp</i>
<i>cpsD-rfp</i> -down (+)	GTTATTGTGATTGCCTAGTAAATTG TAAGTCGGGGGATAGAGATGAATGG AAAAACAG	Amplification de la région en aval de <i>cpsD</i> . La séquence en bleu est complémentaire de <i>rfp</i> -down
JN43- <i>cpsD-rfp</i> -down (+)	GGGAAAATAAAAAAA ACTAGACAT CGAG	Amplification de la région en aval de <i>cpsD</i> à partir du mutant <i>cpsD-rfp</i> . La séquence en bleu correspond au linker séparant le gène d'intérêt et <i>rfp</i>
JN42- <i>cpsD3YF-rfp</i> -down (-)	CTCGATGTCTAGTTTTTTTTATTTTT CCCC AAATCTCCA AA GAACCG AA TT TGTCTACTGAAG	Amplification de la région en amont de <i>cpsD</i> et de <i>cpsD</i> lui-même à partir du mutant <i>cpsD-rfp</i> . Les mutations des tyrosines du YC en phénylalanines sont en rouge. La séquence en bleu est complémentaire de JN43.
JN64- <i>cpsD3YE-rfp</i> -down (-)	CTCGATGTCTAGTTTTTTTTATTTTT CCCC CTCATCTCC CTC AGAACC CTCTT TGTCTACTGAAG	Amplification de la région en amont de <i>cpsD</i> et de <i>cpsD</i> lui-même à partir du mutant <i>cpsD-rfp</i> . Les mutations des tyrosines du YC en acides glutamiques sont en rouge. La séquence en bleu est complémentaire de JN43
Linker- <i>gfp</i> -up (+)	AAACTAGACATCGAGTTCCTGCAGAT GATTTCTAAAGGTGAAGAATTG	Amplification de <i>gfp</i> . La séquence en bleu correspond au linker séparant le gène d'intérêt et <i>gfp</i>
<i>gfp</i> -down (-)	TTATTTATACAATTCATCCATACC	Amplification de <i>gfp</i>
JN30- <i>cpsD-gfp</i> -down (+)	GGTATGGATGAATTGTATAAATAAGT CGGGGGATAGAGATGAATGG	Amplification de la région en aval de <i>cpsD</i> . La séquence en bleu est complémentaire de <i>gfp</i> -down

<i>cpsD-6His-down</i> (+)	GGCCACCATCATCATCATCACGG CTAAGTCGGGGGATAGAGATGAATG G	Amplification de la région en aval de <i>cpsD</i> et de <i>cpsD</i> lui-même. La séquence en bleu correspond à l'étiquette 6-His
<i>cpsD-6His-down</i> (-)	TTAGCCGTGATGATGATGATGATGGT GGCCTTTTTTATTTTCCCGTAATCTC C	Amplification de la région en amont de <i>cpsD</i> et de <i>cpsD</i> lui-même. La séquence en bleu est complémentaire de la séquence 6-His
<i>cpsD3YE-6His-down</i> (-)	TTAGCCGTGATGATGATGATGATGGT GGCCTTTTTTATTTTCCCGTATCTC CC	Amplification de la région en amont de <i>cpsD3YE</i> et de <i>cpsD3YE</i> lui-même. La séquence en bleu est complémentaire de la séquence 6-His
<i>cpsD3YF-6His-down</i> (-)	TTAGCCGTGATGATGATGATGATGGT GGCCTTTTTTATTTTCCCGAAATCTC C	Amplification de la région en amont de <i>cpsD3YF</i> et de <i>cpsD3YF</i> lui-même. La séquence en bleu est complémentaire de la séquence 6-His
JN5- <i>cpsC-up</i> (+)	ATAGACGTCCATTCGCATATCG	Amplification de la région en amont de <i>cpsC</i>
JN63- <i>cpsC-down</i> (-)	CTCCCAAAAACGGCTTCCCTG	Amplification de la région en aval de <i>cpsC</i> et en amont de la séquence codant pour le YC de CpsD
JN6- <i>cpsC-up</i> (-)	CATTATCCATTAAAAATCAAACGGTT CTCCTAAATTAGTTGATCCATTAC	Amplification de la région en amont de <i>cpsC</i> pour sa fusion à la cassette Janus. La séquence en bleu est complémentaire de SG72
JN14- <i>cpsC-down</i> (+)	GGAAAGGGGCCAGGTCTCTAGGAG GAAGTTATGCCAACG	Amplification de la région en aval de <i>cpsC</i> en vue de sa fusion à la cassette Janus. La séquence en bleu est complémentaire de SG73
JN75- <i>cpsC-ΔCter-down</i> (-)	CTAACGTTGGCATAACTTCCTCCTAG AACAACTCAATCAAAAAGAAC	Amplification de la région en amont de <i>cpsC</i> et de <i>cpsC</i> lui-même pour la délétion de l'extrémité C-terminale de CpsC. La séquence en bleu est complémentaire de JN76
JN76- <i>cpsC-ΔCter-down</i> (+)	GAGGAAGTTATGCCAACGTTAG	Amplification de la région en aval de <i>cpsC</i> pour la délétion de l'extrémité C-terminale de CpsC.
JN88- <i>parB-up</i> (+)	CTGACACTTCTCTGATATTGC	Amplification de <i>parB-gfp-spc</i>
JN119- <i>parB-down</i> (-)	GGGATATATTTAACACGCGCATTAGG	Amplification de <i>parB-gfp-spc</i>
<i>ftsZ-up</i> (+)	CCTATCCGCCTCTTGCAAGC	Amplification de <i>ftsZ-kan-rpsL</i> et <i>ftsZ-gfp</i>
<i>ftsZ-down</i> (-)	CTTTTAAAGACATGGTTCTCTCCTAC	Amplification de <i>ftsZ-kan-rpsL</i> et <i>ftsZ-gfp</i>
JN16- <i>cpsH-up</i> (+)	GAGGCATCGTATCGCTTGC	Amplification de la région en amont de <i>cpsH</i>
JN19- <i>cpsH-down</i> (-)	CTAAATCAACCTGCCCTTTTCC	Amplification de la région en aval de <i>cpsH</i>
JN115- <i>cpsH-kan-rpsL-down</i> (-)	CATTATCCATTAAAAATCAAACGGTT ATTTTCTTGCTTAGTCAATCTCATTCC	Amplification de la région en amont de <i>cpsH</i> et de <i>cpsH</i> lui-même. La séquence en bleu est complémentaire de SG72
JN25- <i>cpsH-kan-rpsL-down</i> (+)	GGAAAGGGGCCAGGTCTCTGTGCA TTTATAGGAATGAGATTGAC	Amplification de la région en aval de <i>cpsH</i> . La séquence en bleu est complémentaire de SG73
Linker- <i>sfgfp-up</i> (+)	AAACTAGACATCGAGTTCCTGCAGAT GAAACATCTTACCGTTCTAAAGG	Amplification de la <i>sfgfp</i> . La séquence en bleu correspond au linker séparant le gène d'intérêt et la <i>sfgfp</i>
<i>sfgfp-down</i> (-)	TTATGCGGCCGCTCCACTAGTTTTG	Amplification de la <i>sfgfp</i>
JN113- <i>cpsH-sfGFP-down</i> (+)	CAAACTAGTGGAGCGGCCGCATAAA AATGGATGGGGAAATTCAAGG	Amplification de la région en aval de <i>cpsH</i> . La séquence en bleu est complémentaire de <i>sfgfp-down</i>
JN33- <i>cpsH-sfGFP-down</i> (-)	CTGCAGGAACCTCGATGCTAGTTTTT TTTCTTGCTTAGTCAATCTCATTCC	Amplification de la région en amont de <i>cpsH</i> et de <i>cpsH</i> lui-même. La séquence en bleu est complémentaire du linker

Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes d'intérêt
(+) ou (-) indique le sens de l'amorce

I.2.iii Analyse électrophorétique des fragments d'ADN sur gel d'agarose

Les fragments d'ADN sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 10 g/L dans du Tris-Borate-EDTA 0.5X. Ce gel contient du bromure d'éthydiuim, afin de permettre la visualisation des ADN sous lumière ultra-violette. Avant dépôt, les échantillons sont additionnés de tampon de charge 6X composé de : Tris-HCl 10 mM, pH 7,6 ; bleu de bromophénol 0,03% ; xylène cyanol 0,03% ; glycérol 60 % ; EDTA 60 mM.

I.2.iv Test d'interaction avec l'ADN

Afin de visualiser un retard de migration sur gel d'agarose, 200 fmol d'ADN sont mis en contact avec une concentration croissante de la protéine d'intérêt (de 10 à 40 pmol). Après 10 min à 25 °C suivies de l'ajout de tampon de charge 6X (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6 ; bleu de bromophénol 0,03% ; xylène cyanol 0,03% ; glycérol 60 % ; EDTA 60 mM), l'ensemble est déposé sur un gel d'agarose à 10 g/L dans du Tris-Borate 0.5X additionné de bromure d'éthydiuim et de sulfate de magnésium à 1 mM. Les échantillons sont soumis à une migration à 100 V pendant 70 min puis révélés à l'aide d'une lampe UV.

I.2.v Extraction des fragments d'ADN d'un gel d'agarose

Les fragments d'ADN sont purifiés à l'aide du kit d'extraction et de purification « Nucleospin-Extract II[®] » commercialisé par Macherey-Nagel[®]. Des morceaux de gel d'agarose, contenant les molécules d'ADN à extraire, sont fondus à 50 °C pendant 10 min dans un tampon contenant des sels chaotropiques permettant de séparer les brins d'ADN. Ce mélange est déposé sur une colonne échangeuse d'anions puis rincé par un tampon contenant de l'éthanol. L'ADN est élué par un tampon d'éluion (Tris-HCl 5 mM, pH 8,5). Cette technique de purification permet de préparer les fragments d'ADN issus d'une PCR mais également d'une digestion par des endonucléases de restriction.

I.2.vi Digestion par des endonucléases de restriction

Les réactions de restriction sont réalisées dans le milieu réactionnel suivant :

Tampon de restriction 10X	2 μ L
ADN plasmidique ou produit PCR	0.5 à 5 μ g
Endonucléase	1 U/ μ g d'ADN
H ₂ O	qsp 20 μ L

La réaction s'effectue à 37 °C pendant 1 h 30 et est arrêtée par transfert des tubes dans la glace.

I.2.vii Technique de ligation

La ligation d'un fragment d'ADN dans un vecteur est assurée par l'ADN ligase du phage T4 commercialisée par la société Promega®. Elle est réalisée à 14 °C pendant une nuit ou à température ambiante pendant 3 h dans les conditions suivantes :

Rapport molaire vecteur/insert	1/5
Ligase du phage T4	3 U
Tampon de ligation 10 X	2 μ L
H ₂ O	qsp 20 μ L

I.2.viii Transformation bactérienne

Transformation d'*Escherichia coli*

Une culture de 50 mL est réalisée en milieu LB jusqu'à une Abs₆₀₀ comprise entre 0,4 et 0,5. Cette culture est alors placée dans la glace pendant 20 min avant d'être centrifugée à 1200 x g pendant 5 min à 4 °C. Le culot bactérien ainsi obtenu est repris par 5 mL de tampon TSS (Solution de stockage et de transformation : milieu LB 85% ; PEG 8000 100 g/L ; DMSO 5 g/L ; MgCl₂ 50 mM, pH 6,5) à 4°C. Ces cellules, dès lors compétentes, peuvent être conservées à -80 °C.

20 μ L du milieu de ligation sont incubés avec 100 μ L de ces cellules compétentes pendant 30 min dans la glace. L'ensemble est soumis à un choc thermique à 42 °C pendant 1 min 30. Les cellules sont ensuite placées 2 min dans la glace puis incubées pendant 1 h à 37 °C dans 1 mL de milieu LB sans antibiotique afin de permettre l'expression du gène de résistance. 100 μ L du

milieu de transformation sont enfin étalés sur des boîtes de LB-agar en présence des antibiotiques nécessaires. Ces boîtes sont incubées sur la nuit à 37 °C et les clones positifs sont repiqués dans 2 mL de LB et contrôlés par digestion et séquençage après extraction du plasmide.

Transformation de *Streptococcus pneumoniae*

Les cultures sont réalisées en milieu THY jusqu'à une Abs_{550} comprise entre 0,1 et 0,15. 10 mL de culture sont centrifugés à 5000 x g pendant 5 min à 4 °C. Le culot est repris par 1 mL de THY afin de concentrer la culture 10 fois. 100 µL de ces cellules sont mélangés avec 900 µL de milieu de transformation (THY ; BSA 2 g/L ; $CaCl_2$ 1 mM ; pH 7,8). La compétence des cellules peut alors être induite par l'ajout de CSP (« Compétence-Stimulating Peptide ») à une concentration finale de 100 ng/mL. 100 µL de ces cellules induites sont alors immédiatement mis en contact avec 50 ng de l'ADN d'intérêt et incubés pendant 10 min à 37 °C puis 20 min à 30 °C (Martin *et al.*, 2000). Cette solution est mélangée, dans une boîte de pétri, à 10 mL de milieu THY-agar additionné de sang de cheval dans une proportion de 5 mL pour 140 mL de THY-agar. Après 2 h d'incubation à 37 °C, 10 mL de THY-agar contenant l'antibiotique adéquat sont ajoutés sous forme d'une deuxième couche. Les boîtes sont alors incubées sur la nuit à 37 °C et les clones positifs sont repris dans 3 mL de THY et contrôlés par séquençage.

I.2.ix Construction des mutants de *Streptococcus pneumoniae*

La construction des mutants de *S. pneumoniae* a été réalisée à l'aide de la cassette de résistance Janus (Sung *et al.*, 2001) (**Fig. 27**) qui comporte un gène de résistance à la kanamycine (*kan*) et l'allèle sauvage du gène *rpsL* qui code pour une protéine ribosomique. Préalablement, les souches de *S. pneumoniae*, destinées à accueillir cette construction, doivent exprimer l'allèle muté du gène *rpsL*, *rpsLI*, qui leur confère un phénotype de résistance à la streptomycine. L'allèle *rpsLI* étant récessif par rapport à l'allèle sauvage *rpsL*, la réinsertion de ce dernier dans le génome du pneumocoque, à l'aide de la cassette Janus, confère à la souche un phénotype de sensibilité à la streptomycine. Cette étape permettra dans un deuxième temps de sélectionner par résistance à la streptomycine l'obtention de mutant « propre » après élimination de la cassette Janus.

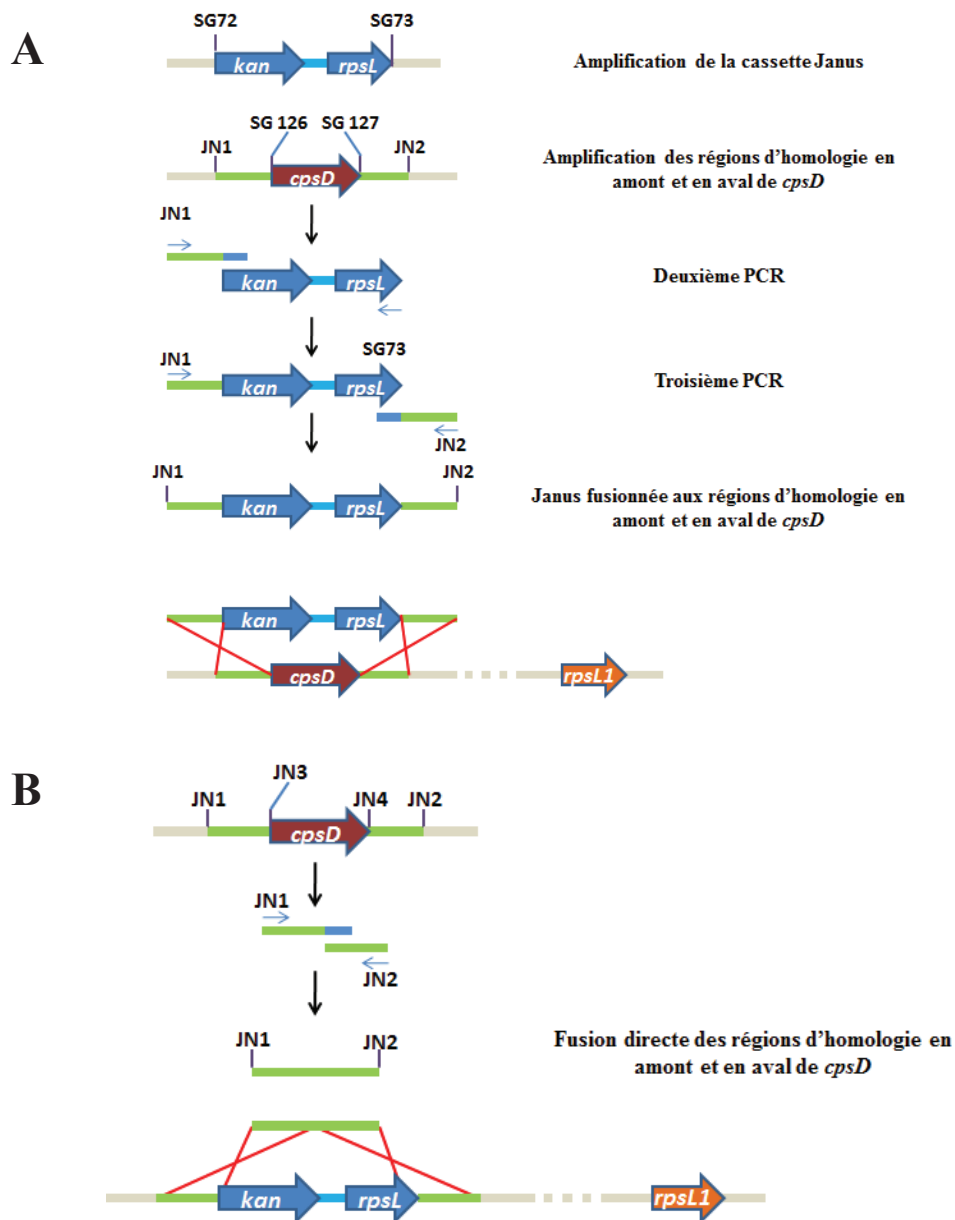


Figure 27 : Constructions permettant une délétion « propre » dans le génome du *S. pneumoniae*

Exemple de l'inactivation d'un gène (codant ici pour *CpsD*). (A) Par PCR successives, la cassette Janus est fusionnée aux régions d'homologie en amont et en aval de *cpsD*. Cette construction peut alors être insérée dans le génome de la bactérie par recombinaison homologue afin d'insérer la cassette Janus à la place de *cpsD*. (B) Par PCR successives, les régions en amont et en aval de *cpsD* sont directement fusionnées l'une à l'autre. Cette construction peut alors être insérée dans le génome de la bactérie par recombinaison homologue afin de retirer la cassette Janus et réaliser un mutant propre de *cpsD*.

La cassette Janus a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique total de la souche R1226 par les amorces SG72 et SG73 (**Tab. 4 et Fig. 27**). Les régions situées en amont et en aval du gène d'intérêt sont amplifiées par PCR à partir de la souche D39 avec les amorces adéquates (**Tab. 4**). Les fragments obtenus sont fusionnés à la cassette Janus par PCR et servent de zones

d'homologie permettant l'insertion de cette cassette au sein du génome de la bactérie par recombinaison homologue (**Fig. 27A**). La souche ainsi obtenue ne possède plus le gène d'intérêt et présente un phénotype de sensibilité à la streptomycine et de résistance à la kanamycine.

Cependant, la présence de la cassette Janus en lieu et place du gène d'intérêt peut perturber l'expression des gènes se situant en aval de ce dernier. De ce fait, la réalisation d'une délétion « propre » est nécessaire. Pour ce faire, une construction conduisant à la fusion directe des fragments en amont et aval du gène d'intérêt est réalisée à l'aide des amorces dédiées (**Tab. 4 et Fig. 27B**).

Cette stratégie peut également s'appliquer pour la réalisation de mutations ponctuelles ou pour l'expression de protéines fusionnées à des protéines fluorescentes. Dans ce cas, un fragment PCR contenant la mutation ou la fusion est inséré par recombinaison homologue à la place de la cassette Janus. Dans le cas de gènes essentiels, la cassette Janus peut également être insérée à la suite du gène d'intérêt évitant ainsi l'étape invalidant le gène.

1.2.x Le système double-hybride en système levure

Principe

La technique de double-hybride en système levure permet de détecter la capacité d'interaction de deux protéines. Cette technique repose sur l'utilisation de la protéine Gal4 qui est un facteur de transcription composé de deux domaines fonctionnels physiquement distincts et pouvant être séparés. Le premier domaine, noté BD, est un domaine de fixation à l'ADN tandis que le second est un domaine d'activation de la transcription et est appelé AD (James *et al.*, 1996). Naturellement, BD se fixe sur la séquence promotrice du gène *gal1*, de plus, la seule proximité de BD et AD suffit à l'activation de la transcription de ce gène. De ce fait, si deux protéines, X et Y, interagissent, il est possible de reconstituer un facteur de transcription fonctionnel équivalent à la protéine Gal4 en exprimant dans la levure les deux protéines de fusion BD-X et Y-AD. Cette interaction est alors détectée par l'activation de la transcription d'un gène rapporteur placé sous le contrôle de la région promotrice de *gal1*. Dans notre étude, ce gène rapporteur, *his3*, permet à la souche de pousser sur un milieu sans histidine.

Plasmides utilisés

Les plasmides pGAD-C1 et pGBDU-C1 ont été mis à notre disposition par le laboratoire de génétique microbienne du Dr. MF Noirot-Gros à Jouy-en-Josas (UMR 1319) (**Fig. 28**). Ces plasmides permettent de fusionner nos protéines d'intérêt aux deux domaines du facteur transcriptionnel Gal4. En effet, les différentes constructions réalisées à partir de pGBDU-C1 (appât) permettent de fusionner les protéines au BD tandis que pGAD-C1 (proie) permet la fusion avec l'AD. Ces plasmides possèdent différents gènes permettant leur sélection en systèmes bactériens et eucaryotes. Pour la sélection en système bactérien, ces plasmides possèdent un gène de résistance à l'ampicilline (*amp*) tandis que pour la sélection au niveau des systèmes eucaryotes, pGBDU-C1 conduit à l'expression du gène *ura3* et pGAD-C1 à celle de *leu2* qui permettent respectivement aux levures de se multiplier sur un milieu en absence d'uracile ou de leucine.

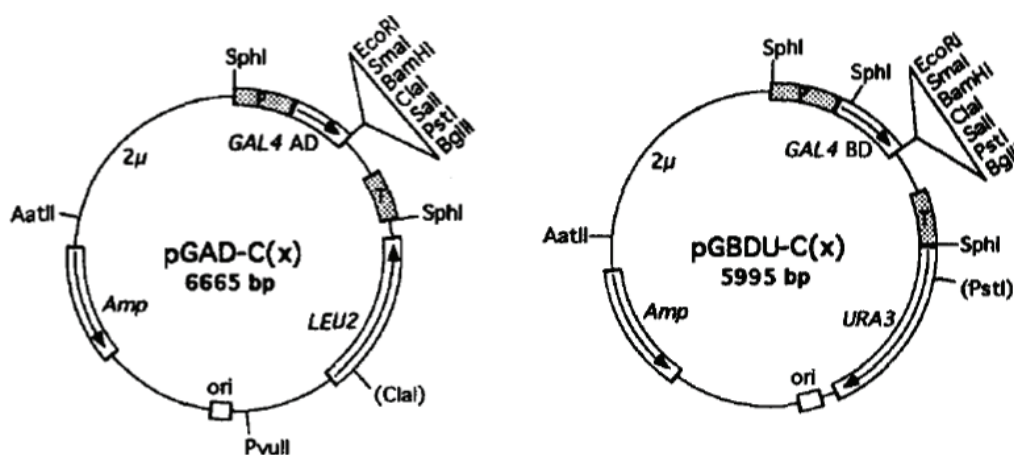


Figure 28 : Schéma de l'organisation des plasmides utilisés dans l'étude double-hybride
 pGAD-C1 permet la formation de protéines "proies" fusionnées au domaine AD tandis que pGBDU-C1 permet la formation de protéines "appâts" fusionnées à BD. Amp : cassette de résistance à l'ampicilline, AD : Domaine d'activation, BD : domaine de fixation à l'ADN, LEU2 et URA3 : gène permettant la croissance des levures en absence de leucine ou d'uracile. D'après James *et al.*, 1996.

Souches utilisées

Le clonage en phase avec BD ou AD, des gènes codant pour CpsD, CpsC ou CpsC amputée de son extrémité C-terminale, a été réalisé dans une souche XL1-Blue d'*E. coli* (**Tab. 3**). L'expression de ces différentes constructions dans les systèmes levure a été réalisée en

collaboration avec le laboratoire du Dr. MF Noiro-Gros. Les souches de levures utilisées sont des souches dérivées de *S. cerevisiae* invalidées du gène exprimant la protéine Gal4 et dont le gène *his3* est sous contrôle de la région promotrice de *gal1*.

L'intérêt des levures dans ces études vient du fait que l'on peut transférer ces différents plasmides dans des levures haploïdes de sexes différents et que leur croisement permettra de générer une levure diploïde exprimant les deux phénotypes. Ainsi, l'interaction entre deux protéines sera détectée par la capacité des levures à se multiplier sur un milieu sans uracile ni leucine (plasmides) mais également sans histidine (gène rapporteur).

I.2.xi Contrôle des clones par séquençage

Chaque souche construite dans cette étude a été vérifiée par séquençage des régions d'intérêt par la société GATC[®]. Les alignements de séquences sont réalisés à l'aide du logiciel ClustalW[®] (Thompson *et al.*, 1994).

I.3 Techniques de biochimie

I.3.i Préparation des échantillons protéiques de *S. pneumoniae*

15 mL de culture sont stoppés à une Abs₅₅₀ de 0,3. Une centrifugation à 4 000 x g pendant 5 min à 4 °C est alors réalisée pour préparer le culot de bactéries. Ce culot est repris par 300 µL de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 ; EDTA 1mM) additionnés d'un cocktail d'anti-protéases (« cOmplete EDTA free[®] », Roche[®]), d'un mélange DNase/RNase à une concentration finale de 6 µg/mL et d'un cocktail d'anti-phosphatases commercialisé par Sigma-Aldrich[®]. Les bactéries sont alors ouvertes par trois cycles successifs de sonication : une fois 20 coups à efficacité 3 et puissance 30 % (20/3/30) et deux fois 20/4/40 (Sonifier 450[®] Branson[®]). Après une seconde centrifugation à 4000 x g pendant 3 minutes, le surnageant est conservé à -20°C.

I.3.ii Surproduction de protéines recombinantes

Principe

500 mL de milieu LB, contenant les antibiotiques appropriés, sontensemencés à une Abs_{600} de 0,05 à partir d'une préculture saturée de bactéries (AD-494 (DE3)) transformées par différents plasmides (pQE30 et pT7.7) et exprimant les protéines d'intérêt. Cette culture est réalisée à 37 °C sous agitation jusqu'à une Abs_{600} comprise entre 0,5 et 0,6. 0,5 mM d'IPTG sont alors additionnés à cette culture afin de stimuler la surproduction de nos protéines d'intérêt. Cette surproduction est réalisée sous agitation pendant 3 h à 37 °C. Les bactéries sont récupérées par centrifugation à 4 000 x g pendant 10 min et le culot bactérien ainsi formé est conservé à -80 °C jusqu'à utilisation.

Plasmides utilisés

La surproduction de nos protéines d'intérêt a été réalisée à l'aide des plasmides pQE30 (**Fig. 29**) et pT7.7 (Tabor et Richardson, 1992). pQE30 est commercialisé par la société Qiagen®. Il possède un site multiple de clonage (MCS) permettant de fusionner six résidus hystidyles à l'extrémité N-terminale de la protéine étudiée. L'expression de la protéine recombinante est sous la dépendance d'une région comprenant le promoteur du phage T5 et deux séquences opératrices *lac*. Le promoteur pT7.7 permet quant à lui de fusionner une étiquette 6-histidines en C-terminal de nos protéines. La région promotrice est reconnue par la polymérase à ARN du phage T7. Ces deux plasmides possèdent une cassette de résistance à l'ampicilline.

I.3.iii Purification de protéines fusionnées à une étiquette 6-histidines

Le culot bactérien obtenu après la surproduction de la protéine recombinante d'intérêt est repris dans 10 mL de tampon A (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; NaCl 300 mM ; Glycérol 10 % ; DTT 1 mM ; imidazole 10 mM) additionnés de lysozyme à 1 mg/L final, d'un mélange de DNase/RNase à 6 mg/L finale et d'un cocktail anti-protéase (« cOmplete EDTA free® », Roche®). Après une incubation de 15 min à 4 °C, la solution est soumise à trois cycles de sonication (une fois 20.3.30 et deux fois 20.4.40) et centrifugée pendant 45 min à 14 000 x g à

4 °C. Le surnageant obtenu est déposé sur 100 µL de résine Ni²⁺-NTA agarose (Qiagen®), préalablement rincée à l'eau distillée et équilibrée dans du tampon A, pendant 45 min à 4 °C sous rotation douce. Les protéines non retenues sont éliminées par quatre rinçages successifs dans du tampon B (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; NaCl 300 mM ; Glycérol 10 % ; DTT 1 mM ; imidazole 30 mM) avec des cycles de centrifugation intermédiaires à 100 x g pendant 5 min à 4 °C. L'éluion de la protéine fixée sur la résine est alors réalisée par quatre bains successifs dans du tampon E (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; NaCl 200 mM ; Glycérol 10 % ; DTT 1 mM ; imidazole 150 mM). Après dosage des fractions d'éluion (cf. § 1.3.v), les fractions contenant de la protéine sont dialysées deux fois 1 h contre 1 L de tampon de dialyse (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; NaCl 100 mM ; Glycérol 10 % ; DTT 1 mM ; MgCl₂ 1 mM) puis conservées à -20 °C.

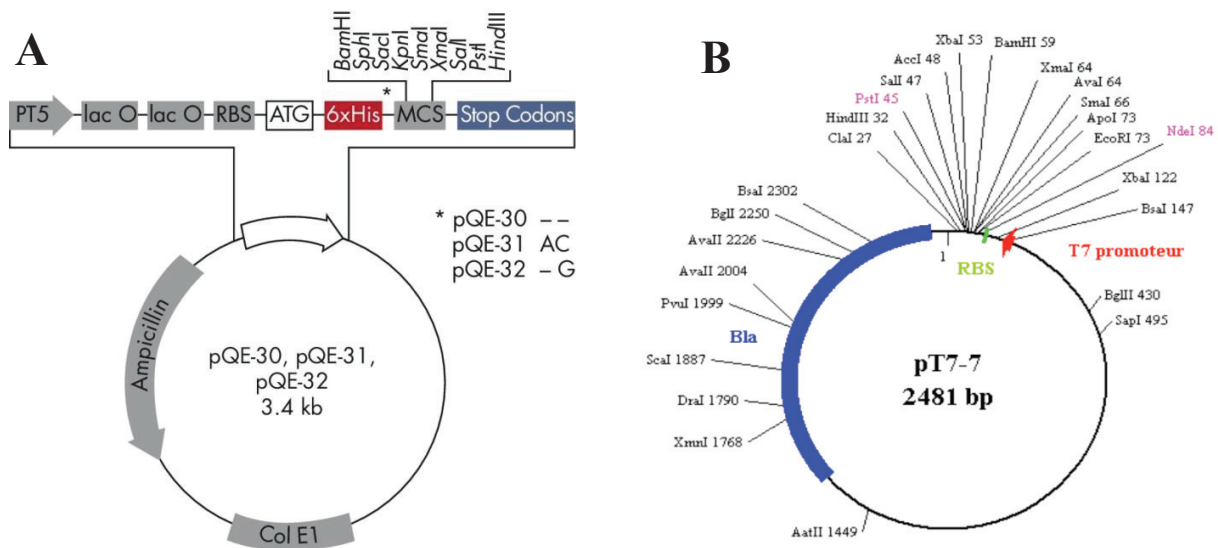


Figure 29 : Organisation schématique des plasmides pQE30 (A) et pT7.7 (B)

Ampicillin et Bla : cassettes de résistance à l'ampicilline, RBS : site de fixation du ribosome, MCS : site multiple de clonage, PT5 : promoteur du phage T5, T7 promoteur : promoteur du phage T7

I.3.iv Co-immunoprécipitation

400 mL des souches d'intérêt de *S. pneumoniae* sont cultivés jusqu'à une Abs₅₅₀ de 0,3 puis centrifugés pendant 10 min à 5 000 x g. Les culots formés sont alors conservés à -80 °C. Ils sont ensuite repris par 5 mL de tampon de reprise (Tris-HCL 50 mM, pH 8,0 ; NaCl 150 mM ; MgCl₂ 5 mM) additionné d'un cocktail d'anti-protéases (« cComplete EDTA free® », Roche®), de lysozyme à 0,1 mg/mL final, de 800 unités de mutanolysine et de DNase/RNase à 0,1 mg/mL

final pendant 15 min à 4 °C. Les bactéries sont ouvertes par trois cycles successifs de sonication (une fois 20/3/30 et deux fois 20/4/40). 1 % de triton X100 est alors ajouté pendant 1 h dans la glace. La solution bactérienne est centrifugée pendant 10 min à 10 000 x g à 4 °C et le surnageant est déposé sur 25 µL de résine « GFP-Trap[®] » (Chromotek[®]) pendant 2 h à 4 °C sous rotation. Après une centrifugation de 2 min à 2 700 x g, la résine est lavée trois fois par du tampon de lavage (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; EDTA 0,5 mM ; anti-protéases ; triton X100 0,1 %) et transférée en tube Eppendorf[®]. L'élution est alors directement réalisée par l'ajout de 50 µL de tampon de dépôt concentré deux fois (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8 ; SDS 40 g/L ; glycérol 20 % ; β-mercaptoéthanol 300 mM ; bleu de bromophénol 0,02 %) et l'ensemble est chauffé pendant 10 min à 95 °C. Le surnageant récupéré après une centrifugation de 2 min à 2 700 x g est alors prêt à être analysé.

I.3.v Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode décrite par Bradford en 1976 (Bradford, 1976). La concentration des protéines présentes dans l'échantillon est mesurée en fonction d'une gamme étalon de dosage de l'albumine de sérum bovin (BSA).

I.3.vi Analyse sur gel de polyacrylamide

La séparation des protéines s'effectue en présence de SDS. Le gel de polyacrylamide est formé d'un maillage plus ou moins lâche, selon la concentration d'acrylamide/bisacrylamide, adapté à la taille des protéines à séparer. Ces gels sont constitués de deux parties : un gel de concentration (acrylamide/bisacrylamide 50 g/L, Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 ; SDS 1 g/L ; persulfate d'ammonium 1 g/L ; TEMED 0,1 %) et un gel de séparation (acrylamide/bisacrylamide 150 g/L ; Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 ; SDS 1 g/L ; persulfate d'ammonium 1 g/L ; TEMED 0,04 %).

Avant d'être déposés, les échantillons protéiques sont additionnés de tampon de dépôt (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8 ; SDS 20 g/L ; glycérol 10 % ; β-mercaptoéthanol 150 mM ; bleu de bromophénol 0,01 %). La migration s'effectue sous 80 V pour le gel de concentration puis sous

200 V pour le gel de séparation dans un tampon composé de Tris-HCl pH 8,3 à 25 mM, de glycine à 190 mM et de SDS à 1 g/L.

I.3.vii Transfert et immunodétection

Principes

Après séparation sur gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF) préalablement baignée dans un bain de méthanol pur puis dans un bain de tampon de transfert de composition : Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 ; glycine 190 mM ; méthanol 20 % ; SDS 0,4 g/L. Le transfert est effectué à 24 V constant pendant 45 min.

La membrane est ensuite rincée pendant 10 min dans du tampon salin additionné de Tween 20 (TBS-T : Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 ; NaCl 150 mM ; Tween 20 0,05 %) puis incubée pendant 1 h sous agitation dans ce même tampon additionné de BSA à 50 g/L. Après trois nouveaux rinçages de 10 min dans du TBS-T, la membrane est incubée pendant 1 h dans du TBS-T additionné de BSA à 10 g/L et contenant l'anticorps primaire désiré à la dilution adéquate. La membrane est de nouveau rincée trois fois 10 min dans du TBS-T avant d'être incubée 1 h dans du TBS-T additionné de BSA à 10 g/L et contenant un anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin couplé à la peroxydase de Raifort et dilué au 5000^{ème}. Après quatre rinçages de 10 min dans du TBS-T, la révélation est effectuée par ajout de luminol *via* l'usage du kit « SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate[®] » commercialisé par la société Pierce[®] suivi de l'exposition de la membrane sur un film MS (Kodak[®]).

Anticorps utilisés

Les protéines phosphorylées sur les résidus tyrosyles sont détectées par l'utilisation de l'anticorps monoclonal PY-20 commercialisé par Sigma-Aldrich[®]. Cet anticorps, produit chez la souris, est utilisé au 1/2 000^e dans une solution de TBS-T additionnée de 1 % de BSA.

Les protéines fusionnées à la GFP sont détectées à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-GFP produit chez le lapin et commercialisé par Amsbio[®]. Cet anticorps est utilisé au 1/10 000^e dans une solution de TBS-T additionnée de 1 % de BSA.

Les protéines fusionnées à une étiquette 6-histidines sont révélées à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-polyhistidines produit chez la souris. Cet anticorps commercialisé par Sigma-Aldrich[®] est utilisé au 1/1 500^e dans du TBS-T additionné de 1 % de BSA.

Les anticorps secondaires anti-IgG de lapin ou de souris sont commercialisés par Biorad[®]. Ce sont des anticorps polyclonaux produits chez la chèvre et fusionnés à la peroxydase de raifort (HRP). Ils sont utilisés au 1/5 000^e dans du TBS-T additionné de 1 % de BSA.

I.3.viii La thermophorèse

La thermophorèse est une méthode récente permettant de réaliser des analyses quantitatives d'interactions moléculaires en solution. Cette technique est basée sur la mobilité des protéines le long d'un gradient de température. En effet, une variation de température à un endroit précis conduit à une thermodiffusion positive ou négative des molécules et donc à un changement de la concentration en molécules dans la zone chauffée. Cette thermodiffusion est dépendante de l'interface entre la molécule et le solvant.

La thermophorèse d'une molécule marquée par une sonde fluorescente sera donc différente de la thermophorèse de cette même molécule en complexe avec une seconde molécule du fait de sa taille, sa charge et sa surface hydrophile. Ainsi, cette différence de mobilité est mesurée par thermophorèse afin de quantifier la capacité d'interaction de deux molécules.

Le mouvement thermophorétique de la molécule marquée est mesuré par enregistrement de la distribution de la fluorescence à l'intérieur d'un capillaire. Le gradient de température est généré par un laser à infrarouges qui cible une région microscopique du capillaire. Avant que le laser soit actionné, l'homogénéité de la distribution de fluorescence au sein du capillaire est contrôlée. Sous l'action de la température, les molécules migrent de la région chauffée vers la région plus froide. Ainsi, la concentration locale de molécules diminue dans la région chauffée

jusqu'à l'acquisition d'un état stable. Les données quantitatives d'interactions sont obtenues grâce à la réalisation de cette approche sur une série de dilution de la molécule d'intérêt non marquée. Nous avons réalisé cette expérience à l'aide de l'appareil Monolith NT.Label Free (Nano Temper Technologies GMBH) en collaboration avec le Dr. Morlot de l'IBS à Grenoble.

I.4 Techniques de microscopie

I.4.i Microscopie optique

Observation des protéines fluorescentes

Afin d'observer la localisation des protéines fusionnées à la RFP, la GFP ou la sfGFP, 10 mL de cultures sont réalisés jusqu'à une Abs_{550} de 0,3 à 37 °C. Après une centrifugation à 3 000 x g pendant 5 min à 4 °C, ces cultures sont lavées par 1 mL de PBS et transférées en Eppendorf®. Une seconde centrifugation est alors réalisée et les culots obtenus sont repris par 50 à 100 µL de PBS pour être observés.

Coloration des membranes et de l'ADN

La coloration des membranes bactériennes est réalisée à l'aide du colorant FM4-64 commercialisé par Molecular Probes® et les nucléoïdes sont colorés par du DAPI. Pour ce faire, 10 µL de culture à une Abs_{550} de 0,3 sont mélangés à 0,5 µL de FM4-64 à 1 mg/mL et 1 µL de DAPI à 2 mg/mL. Ces échantillons sont observés après 5 min à température ambiante.

Immunomarquage *in vivo* de la capsule polysaccharidique

Après croissance des bactéries jusqu'à une Abs_{550} de 0,3, 1 mL de culture est prélevé et déposé dans un tube Eppendorf®. 1 µL d'anticorps primaires dirigés contre le polysaccharide de type 2 spécifique de la souche D39 de *S. pneumoniae* (Statens serum Institute®) est ajouté pendant 5 min dans la glace. Les échantillons sont alors centrifugés pendant 5 min à 4 000 x g à 4 °C et lavés trois fois par du THY à 37 °C. Le culot ainsi formé est repris par 1 mL de THY à 37 °C auquel 0,5 µL d'anticorps secondaires anti-lapin, conjugués à la molécule fluorescente

DyLight-549 (Jackson ImmunoResearch[®]), sont ajoutés pendant 5 min dans la glace. Après un nouveau lavage au THY à 37 °C et un au PBS, les échantillons sont repris par 10 µL de PBS pour observation.

Matériels utilisés

Tous ces échantillons sont observés par le microscope Zeiss Axio Observer Z1[®] associé à une caméra CCD Orca-R2 C10600[®] (Hamatsu[®]) et à un objectif 100 x NA 1.46. Les images sont traitées et analysées par ImageJ[®] et/ou MicrobeTracker[®].

I.4.ii Microscopie électronique à transmission

15 ml de culture des souches d'intérêt de *S. pneumoniae* sont réalisés à 37 °C jusqu'à une Abs₅₅₀ de 0,3. Les bactéries sont ensuite récupérées par centrifugation pendant 5 min à 500 x g. Le culot est repris par 500 µL de fixateur I (glutaraldéhyde 5 % ; rouge de ruthénium 0,075 % ; lysine monohydrochloride 0,075 M ; cacodylate 0,1 M, pH 7,4) et transféré en tube Eppendorf[®]. Après 20 minutes dans la glace, la solution est centrifugée à 1 000 x g pendant 5 min. Le culot formé est lavé par l'ajout de 1 mL de tampon de lavage (cacodylate 0,1 M, pH 7,4 ; rouge de ruthénium 0,075 %) et centrifugé à 500 x g pendant 10 min. Les bactéries sont alors reprises par 500 µL de fixateur II (glutaraldéhyde 5 % ; rouge de ruthénium 0,075 % ; cacodylate 0,1 M, pH 7,4) pendant toute une nuit à 4 °C. La solution est alors centrifugée à 500 x g pendant 10 min et lavée par 1 mL de tampon de lavage. Après le lavage le culot est repris par 50 µL de tampon de lavage auxquels 100 µL d'agarose 2 % sont ajoutés. La goutte d'agarose contenant les bactéries fixées est alors découpée en petits dés disposés à l'intérieur d'un pilulier afin de réaliser la déshydratation de ces échantillons. Ces cubes sont lavés trois fois dans 2 mL de tampon de lavage pendant 1 h. Les échantillons sont ensuite baignés dans du tampon de post-fixation contenant du tétr oxyde d'osmium (OsO₄ 10 g/L ; cacodylate 0,1 M, pH 7,4 ; rouge de ruthénium 0,075 %) pendant 1 h, puis rincés à l'eau distillée et déshydratés progressivement par différents bains successifs d'éthanol (de 30 % à 100 %) d'une durée de 30 min chacun à 4 °C. Les échantillons sont ensuite incubés dans des bains de substitution afin d'intégrer la résine LR-white. Pour ce faire, un premier bain composé de 50 % de LR-White et 50 % d'éthanol est réalisé pendant 1 h,

un second composé de 66 % de LR-white et 34 % d'éthanol durant toute une nuit à 4 °C, un troisième dans 100 % de LR-White pendant 8 h à 4 °C et enfin un dernier bain dans 100 % de LR-White durant toute une nuit à 4°C. Le lendemain, les échantillons sont déposés dans des capsules et sont recouverts de LR-White frais. La polymérisation a alors lieu pendant 2 jours à 60 °C.

Les étapes suivantes ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Cluzel-Grangeasse Caroline (LBTI, UMR 5305, Lyon). Les blocs formés après la polymérisation sont découpés à l'ultra-microtome (Leica U17[®]). Des coupes ultrafines (60 nm d'épaisseur) sont récoltées sur des grilles adaptées à l'observation par microscopie électronique à transmission (MET) et contrastées à l'acétate d'uranyle à saturation 7 % dans du méthanol pendant 10 min à l'abri de la lumière et de la chaleur. Les échantillons sont ensuite contrastés au citrate de plomb (nitrate de plomb 44 µg/mL, citrate de sodium 58 µg/mL ; Reichert Ultrastainer[®], Leica[®]) et rincés dans de la soude 0,02 N puis dans trois bains successifs d'eau distillée. Les grilles sont séchées sur papier filtre dans une boîte de Pétri avant observation par MET (Phillips CM120[®], centre des microstructures, Villeurbanne).

1.5 Tests de virulence

Afin de réaliser nos tests de virulence nous avons utilisé des larves de *Galleria mellonella* (Evans et Rozen, 2012). Pour ce faire, une culture de pneumocoque est réalisée à 37 °C jusqu'à une Abs₅₅₀ de 0,3. Cette culture est aliquotée au sein de plusieurs tubes Eppendorf[®] conservés à -80 °C. Un de ces aliquots est alors décongelé afin de réaliser une numération du nombre de cfu présentes dans chaque aliquot par étalement dans la masse, à une dilution à 10⁻⁵, dans du THY-Agar additionné de 5 % de sang de cheval défibriné. L'injection de 10⁶ cfu est alors réalisée à l'aide d'une seringue Hamilton[®] au niveau du premier appendice arrière de la larve. Une fois infectées, les larves sont déposées dans une étuve à 37 °C et leur taux de mortalité est relevé toutes les 24 h.

II Résultats

Comme nous l'avons vu dans l'exposé bibliographique (cf. § II.3.iii), il a récemment été montré que, chez *S. pneumoniae*, la tyrosine-kinase bactérienne CpsD et son modulateur transmembranaire CpsC sont tous deux requis pour la synthèse septale de polysaccharides capsulaires (Henriques *et al.*, 2011). Il a alors été proposé que deux machineries de synthèse et d'export de la capsule polysaccharidique pourraient exister : une machine septale dont la localisation et le fonctionnement seraient dépendants de CpsD et une deuxième machine indépendante de CpsD et localisée tout autour de la bactérie (**Fig. 20**). Vu l'importance de la phosphorylation de CpsD dans la biosynthèse et l'export des polysaccharides capsulaires (Morona *et al.*, 2000a), il nous a semblé intéressant de tester ce modèle en fonction des états de phosphorylation de CpsD.

II.1 L'autophosphorylation de CpsD est contrôlée par l'extrémité C-terminale de CpsC

Tout d'abord, afin de confirmer que, chez *S. pneumoniae*, la BY-kinase, CpsD, et son modulateur transmembranaire, CpsC, étaient capables d'interagir, nous avons utilisé la méthode du double-hybride en système levure (**Fig. 30A**). Pour ce faire, nous avons construit les plasmides pGAD-C1-*cpsD*, exprimant CpsD fusionnée au domaine d'activation de la transcription du gène *gal4*, pGBDU-C1-*cpsC* et pGBDU-C1-*cpsC* Δ Cter, exprimant respectivement CpsC et sa forme tronquée de son extrémité C-terminale fusionnées au domaine de liaison à la région promotrice de *gal4*. Des levures haploïdes de sexes différents ont été transfectées par ces plasmides et sélectionnées sur un milieu sans uracile, leucine et histidine afin d'évaluer la capacité de CpsD à interagir avec CpsC. Nous avons alors observé que ces deux protéines sont capables d'interagir et que cette interaction est dépendante de l'extrémité C-terminale de CpsC. En effet, en absence de cette extrémité, l'interaction entre CpsC et CpsD n'est plus observée (**Fig. 30A**).

Dans un second temps, pour confirmer cette observation, nous avons testé si l'extrémité C-terminale de CpsC était nécessaire à l'autophosphorylation de CpsD *in vivo* (**Fig. 30B**). Nous avons donc construit une souche de pneumocoque dans laquelle nous avons retiré l'extrémité C-

terminale de CpsC. Après préparation des extraits totaux de protéines, nous avons analysé par Western-blot, à l'aide d'anticorps anti-phosphotyrosine, la capacité de CpsD à s'autophosphoryler. Nous avons ainsi observé qu'en absence de l'extrémité C-terminale de CpsC, CpsD n'est plus phosphorylée (**Fig. 30B**). Ceci confirme que l'extrémité C-terminale de CpsC est nécessaire à l'autophosphorylation, et donc à l'activation de CpsD.

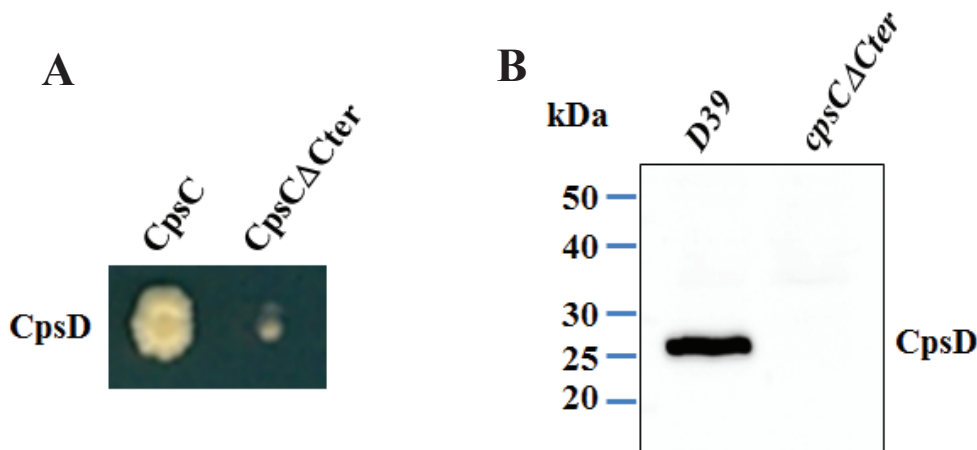


Figure 30 : Etude de l'interaction entre CpsC et CpsD

(A) Double-hybride en système levure. L'interaction entre CpsD et CpsC est dépendante de l'extrémité C-terminale de CpsC (B) Western-Blot anti phosphotyrosine sur des extraits protéiques totaux. L'autophosphorylation de CpsD est dépendante de l'extrémité C-terminale de CpsC.

II.2 L'interaction CpsC/CpsD est nécessaire à la synthèse septale de CPS

Afin d'évaluer si l'interaction entre CpsC et CpsD influence la synthèse des CPS, nous avons observé la localisation des CPS produits dans la souche *cpsCΔCter*. Pour ce faire, nous avons incubé les bactéries en présence d'anticorps directement dirigés contre ces CPS. Dans une deuxième étape, l'utilisation d'anticorps secondaires fusionnés à un fluorophore nous permet de visualiser la présence des CPS à l'extérieur des cellules par microscopie (**Fig. 31**). Nous avons validé notre approche en observant une souche sauvage D39 produisant de la capsule et le mutant *ΔcpsD* dont l'absence de CPS au niveau du site de division a déjà été relevée (Henriques *et al.*, 2011). Comme attendu, les CPS produits sont détectés tout autour de la cellule dans la souche D39 alors qu'ils sont absents au niveau du site de division en absence de CpsD. De manière intéressante, nous avons observé que les CPS n'étaient pas détectés au niveau du septum dans la souche *cpsCΔCter*. Cette première observation montre que le domaine C-terminal de CpsC,

nécessaire à l'interaction entre CpsC et CpsD et à l'autophosphorylation de CpsD, est également requis pour la synthèse septale de polysaccharides. L'interaction entre CpsC et CpsD et/ou l'autophosphorylation de CpsD sont donc nécessaires à la synthèse de CPS.

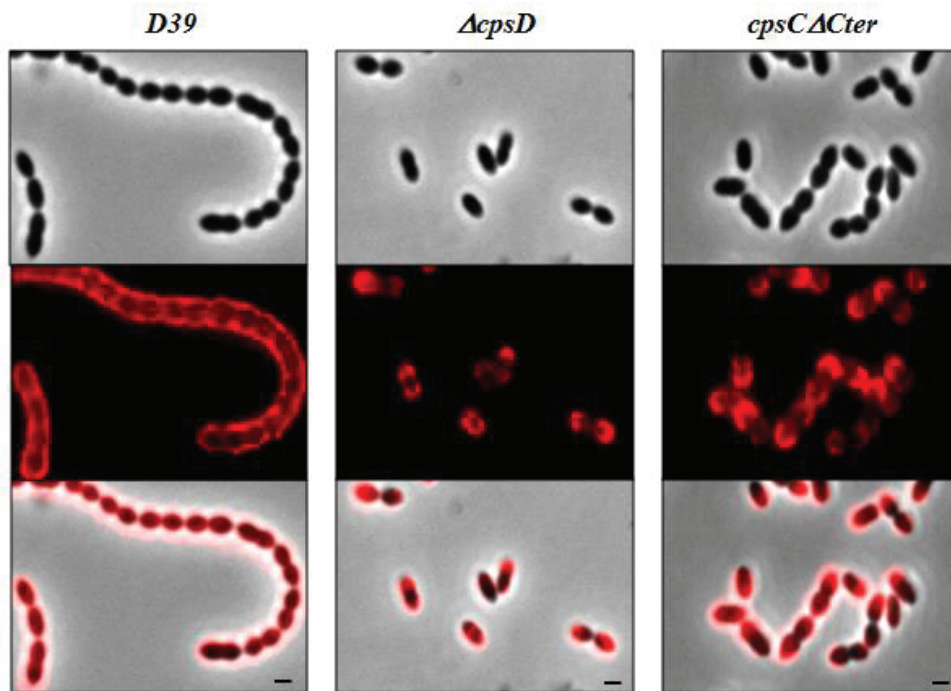


Figure 31 : Immunomarkage *in vivo* des CPS

De haut en bas, les images correspondent au contraste de phase, au signal fluorescent détecté et à la superposition de ces deux images. Les CPS sont produits tout autour de la bactérie sauvage (D39) alors qu'ils ne sont pas détectés au niveau du site de division en absence de CpsD ($\Delta cpsD$) ou de l'extrémité C-terminale de CpsC ($cpsC\Delta Cter$).

Barres d'échelle = 1 μ m

II.3 Localisation de CpsD

Afin d'expliquer l'absence de CPS au site de division du pneumocoque en absence de CpsD, nous avons tout d'abord localisé la BY-kinase CpsD dans la souche sauvage ainsi que dans la souche dans laquelle nous avons retiré l'extrémité C-terminale de CpsC (**Fig. 32A**). Comme contrôle, nous avons analysé la fonctionnalité de la fusion CpsD-RFP en suivant la courbe de croissance (**Fig. 32B**) et la production du polysaccharide capsulaire par immunomarkage *in vivo* dans la souche exprimant CpsD-RFP (**Fig. 32C**). Ces deux expériences montrent que l'expression de la fusion CpsD-RFP n'a aucun effet sur la croissance bactérienne ainsi que sur la synthèse de capsule par rapport à la souche D39. La fusion CpsD-RFP est donc

fonctionnelle. Nous avons alors observé que CpsD est localisée au site de division de la bactérie sauvage comme cela a été précédemment décrit (Henriques *et al.*, 2011). En revanche, en absence de l'extrémité C-terminale de CpsC, CpsD délocalise dans le cytoplasme de la bactérie. Cette analyse montre que la localisation septale de CpsD est due à l'extrémité C-terminale de CpsC et qu'elle est nécessaire à la synthèse septale de polysaccharides capsulaires. Elle est également cohérente avec nos études d'interaction entre CpsC et CpsD.

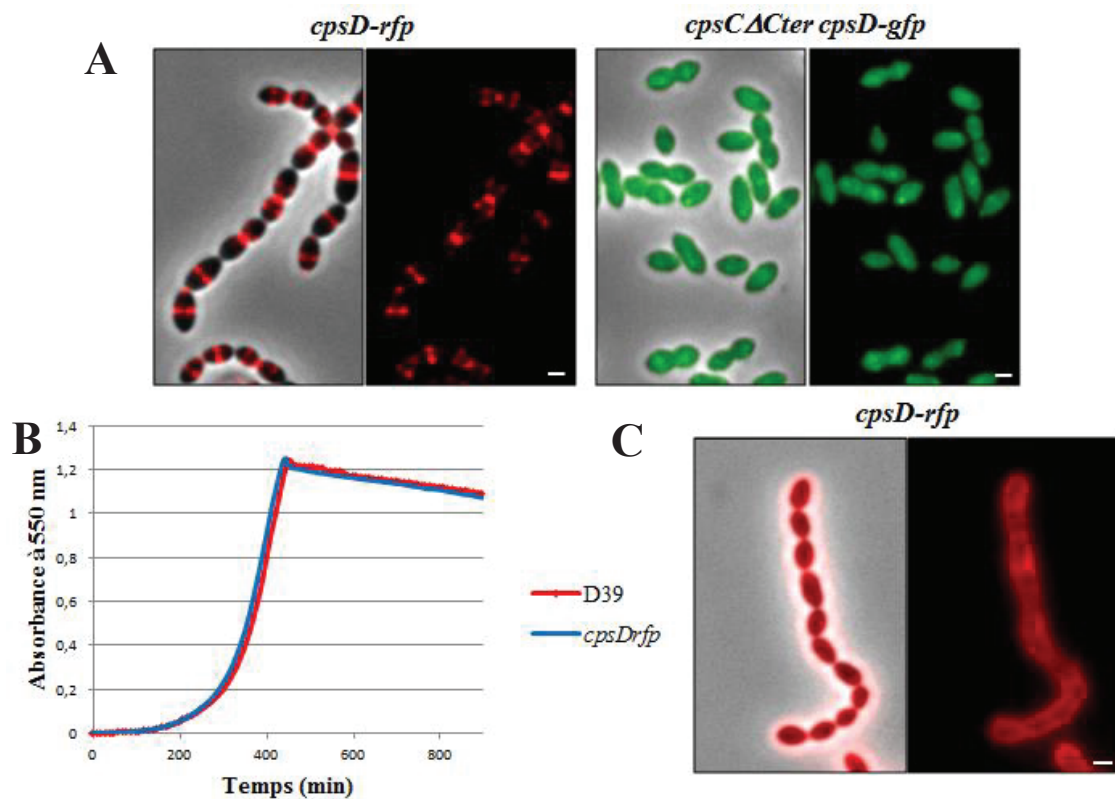


Figure 32 : Localisation de la BY-kinase CpsD

Les images de gauche correspondent au contraste de phase superposé au signal fluorescent détecté alors que celles de droite correspondent au signal de fluorescence seul. (A) CpsD est localisée au site de division de la bactérie sauvage. En absence de l'extrémité C-terminale de CpsC, CpsD délocalise dans le cytoplasme de la bactérie. (B) Courbes de croissance réalisées avec la souche sauvage (D39) et le mutant *cpsD-rfp*. (C) Immunomarquage *in vivo* des CPS produits dans la souche *cpsD-rfp*. Les CPS sont présents tout autour de la bactérie comme dans une souche sauvage (Fig. 31). Barres d'échelle = 1 μ m

II.4 Localisation de CpsH, la polymérase des polysaccharides capsulaires

Les observations présentées dans la Figure 31 montrent que la capsule est produite tout autour de la bactérie mais ne renseignent pas sur la localisation de la machinerie nécessaire à sa

production. Nous avons décidé de suivre la localisation de la machinerie de synthèse des CPS dans nos différentes souches. Pour ce faire, nous avons utilisé la polymérase CpsH comme marqueur de l'emplacement de la machinerie de synthèse des CPS. Cette protéine étant transmembranaire, nous avons tout d'abord réalisé une série de prédictions de passages transmembranaires à l'aide du logiciel TMPRED (Hofmann et Stoffel, 1993) afin de déterminer si l'une de ses extrémités était cytoplasmique afin de la fusionner à la GFP (**Fig. 33**). Cette analyse nous a fourni un modèle pour lequel les deux extrémités de CpsH sont à l'extérieur de la bactérie.

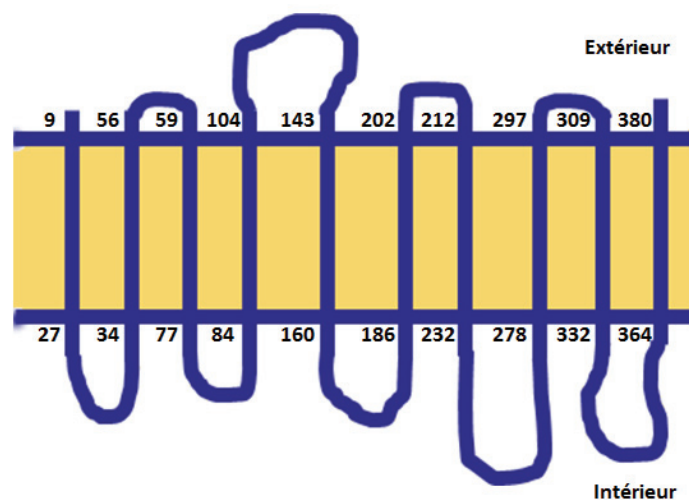


Figure 33 : Topologie de CpsH

Prédiction des passages transmembranaires de la polymérase CpsH à l'aide du logiciel TMPRED (Hofmann et Stoffel, 1993)

Nous avons donc construit une souche dans laquelle CpsH est fusionnée à une GFP « super-enroulée » (sfGFP) permettant de visualiser les protéines extracellulaires (**Fig. 34**). La fonctionnalité de la protéine CpsH fusionnée à la GFP super-enroulée a été contrôlée en suivant la courbe de croissance de la souche *cpsH-sfgfp* (**Fig. 34B**) et en vérifiant la production du polysaccharide capsulaire par immunomarquage *in vivo* dans la souche sauvage exprimant CpsH-GFP (**Fig. 34C**). Ces deux expériences montrent que la fusion de cette protéine à la GFP super-enroulée n'a aucun effet sur la croissance de la bactérie ainsi que sur la présence de CPS tout autour de la bactérie. L'analyse de la localisation de CpsH dans la souche sauvage montre que CpsH n'est présente qu'au septum des bactéries et qu'elle n'est jamais présente au niveau de la membrane autour de la cellule (**Fig. 34A**). Cette première observation va à l'encontre du modèle des deux machineries de synthèse des CPS proposé récemment (Henriques *et al.*, 2011). On

remarque également que CpsH est majoritairement délocalisée en absence de CpsD ou de l'extrémité C-terminale de CpsC (**Fig. 34A**). Cette délocalisation de la polymérase est en accord avec les défauts de production de CPS observés précédemment. Ainsi, nous pouvons conclure que la localisation septale de CpsD par l'intermédiaire de son interaction avec l'extrémité C-terminale de CpsC est nécessaire à une localisation septale de la polymérase CpsH, et donc de la machinerie de synthèse. Ces observations démontrent également que la capsule polysaccharidique est exclusivement produite au septum de la bactérie.

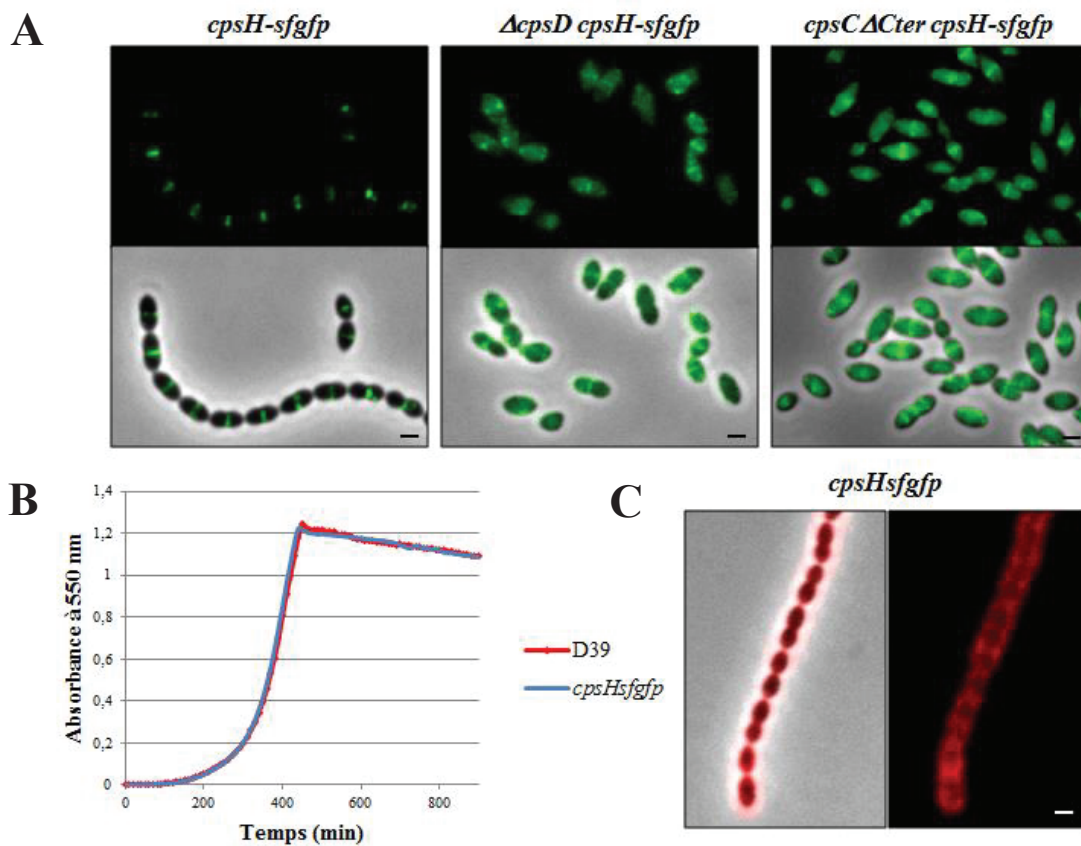


Figure 34 : Localisation de la polymérase CpsH

(A) Les images du haut correspondent au signal de fluorescence seul alors que celles du bas correspondent à ce signal superposé au contraste de phase. CpsH est fusionnée à une GFP super-enroulée. Elle localise au septum du pneumocoque sauvage alors qu'elle délocalise en absence de CpsD ou de l'extrémité C-terminale de CpsC. (B) Courbes de croissance réalisées sur la souche sauvage (D39) et le mutant *cpsH-sfgfp*. Ces deux courbes se superposent parfaitement. (C) Immunomarquage *in vivo* des CPS produits dans la souche *cpsH-sfgfp*. L'image de gauche correspond au contraste de phase superposé au signal fluorescent détecté alors que celle de droite correspond au signal de fluorescence seul. Les CPS sont présents tout autour de la bactérie comme dans une souche sauvage (Fig. 31). Barres d'échelle = 1 μ m

II.5 L'autophosphorylation de CpsD est nécessaire à la localisation de CpsH et à la synthèse de CPS au septum de la bactérie.

L'extrémité C-terminale de CpsC étant indispensable à l'autophosphorylation de CpsD (**Fig. 30**), nous avons également voulu étudier quelle était l'importance de la phosphorylation de CpsD dans la synthèse des CPS. Pour ce faire, nous avons construit deux souches dans lesquelles les résidus tyrosyles du cluster de tyrosines de la protéine CpsD sont remplacés par des résidus phénylalanyles (*cpsD3YF*) ou glutamyles (*cpsD3YE*). Ces mutations permettent, respectivement, de mimer un état non-phosphorylé de CpsD dit « phosphoablative » et un état phosphorylé dit « phosphomimétique ».

Comme précédemment, nous avons analysé la localisation des CPS produits au sein de ces souches ainsi que la localisation des formes mutées de CpsD. La souche exprimant la forme phosphomimétique de CpsD (*cpsD3YE*) présente une synthèse de CPS normale, tout autour de la bactérie alors que la souche exprimant la forme non-phosphorylée de CpsD (*cpsD3YF*) ne produit pas de CPS au niveau du septum (**Fig. 35A**). De façon surprenante, CpsD est bien localisée quel que soit son état de phosphorylation (**Fig. 35B**). Ces observations indiquent donc que l'absence de polysaccharides capsulaire au site de division de la souche exprimant la forme phosphoablative de CpsD n'est pas due à la délocalisation de CpsD mais à son état de phosphorylation. CpsD doit être présente au septum sous sa forme phosphorylée pour permettre une synthèse de CPS normale.

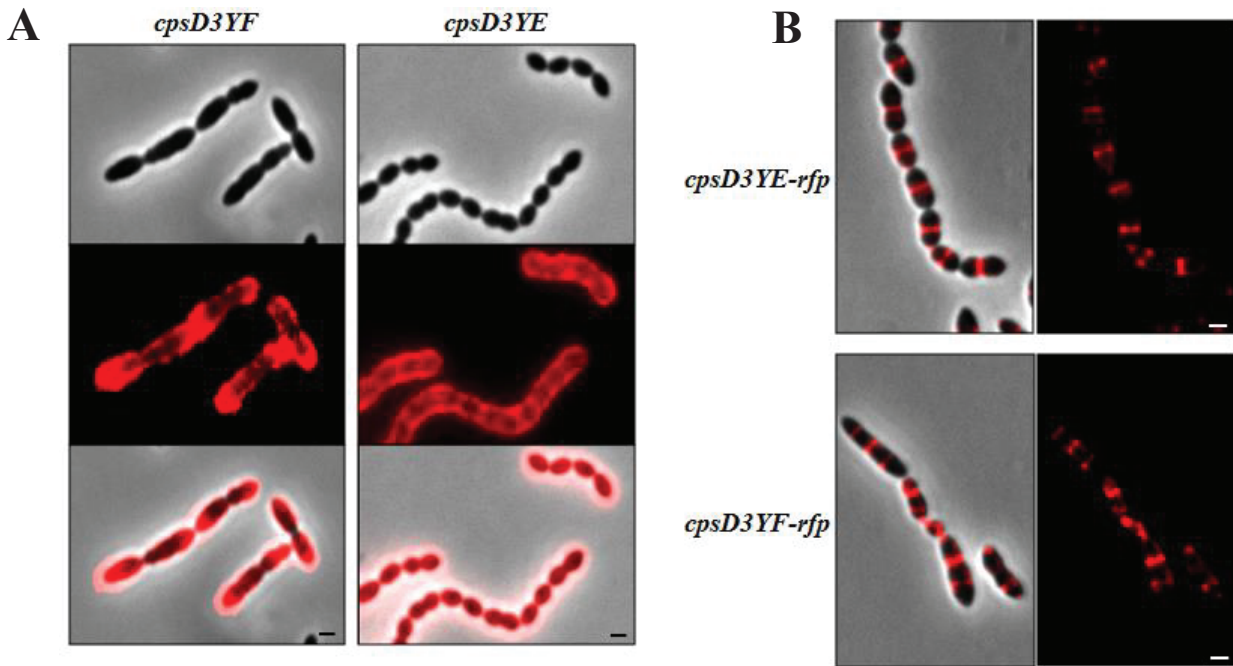


Figure 35 : L'autophosphorylation de CpsD est nécessaire à la synthèse de CPS

(A) Immunomarkage *in vivo* de la production de CPS. De haut en bas, les images correspondent au contraste de phase, au signal fluorescent détecté et à la superposition de ces deux images. Les CPS sont produits tout autour de la souche exprimant la forme phosphomimétique de CpsD (*cpsD3YE*) tandis qu'ils sont absents du septum dans celle exprimant la forme phosphoablative (*cpsD3YF*). (B) Localisation des mutants de CpsD fusionnés à la RFP. Les images de gauche correspondent au contraste de phase superposé au signal fluorescent détecté alors que celles de droite correspondent au signal de fluorescence seul. CpsD est localisée au site de division de la bactérie quel que soit son état de phosphorylation. Barres d'échelle = 1 μm

Nous avons alors contrôlé la localisation de la machinerie de synthèse du polysaccharide au sein de ces souches à l'aide de la polymérase CpsH fusionnée à la GFP super-enroulée (**Fig. 36**). CpsH est correctement localisée dans la souche exprimant la forme phosphomimétique de CpsD alors qu'elle délocalise partiellement dans la souche exprimant la forme non-phosphorylable CpsD3YF. Ces observations démontrent que l'autophosphorylation de CpsD est nécessaire à la localisation de CpsH au septum pour permettre une production optimale de CPS.

II.6 L'autophosphorylation de CpsD impacte la taille des cellules du pneumocoque

De manière très surprenante, lors de l'analyse des images de microscopie (**Fig. 35**), nous avons également constaté que les mutants exprimant la forme phosphoablative de CpsD (*cpsD3YF*) présentent des formes aberrantes et les cellules semblent être allongées.

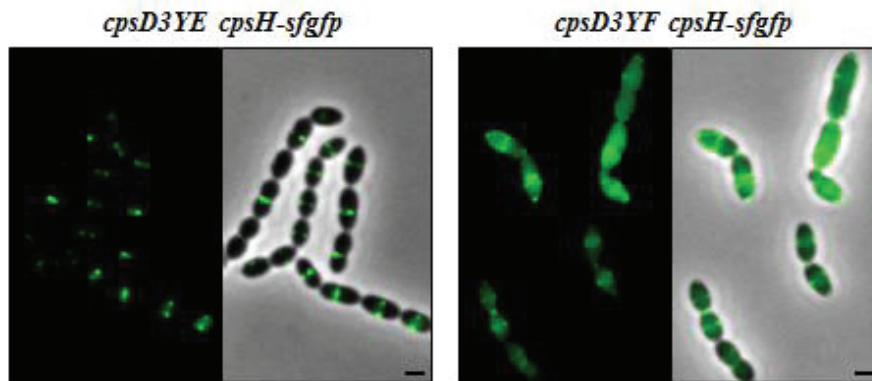


Figure 36 : Localisation de CpsH dans les souches mutantes de CpsD

Les images de gauche correspondent au signal de fluorescence seul alors que celles de droite correspondent au contraste de phase superposé au signal fluorescent détecté. La polymérase CpsH est bien localisée au niveau du site de division bactérien en présence de la forme phosphomimétique de CpsD alors qu'elle est complètement délocalisée en présence de la forme non phosphorylée. Barres d'échelle = 1 μm

L'allongement des cellules de la souche *cpsD3YF* nous a amené à analyser la longueur des cellules des différents mutants. Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel MicrobeTracker[®] sur des échantillons d'environ 4 000 cellules à partir des images en contraste de phase. Nous avons observé que le mutant exprimant la forme non phosphorylable de CpsD (*cpsD3YF*) présente une longueur supérieure à celle obtenue à partir de la souche sauvage (D39). A l'inverse, il semblerait que la souche exprimant la forme phosphomimétique de CpsD (*cpsD3YE*) soit plus petite que la souche sauvage (**Fig. 37**).

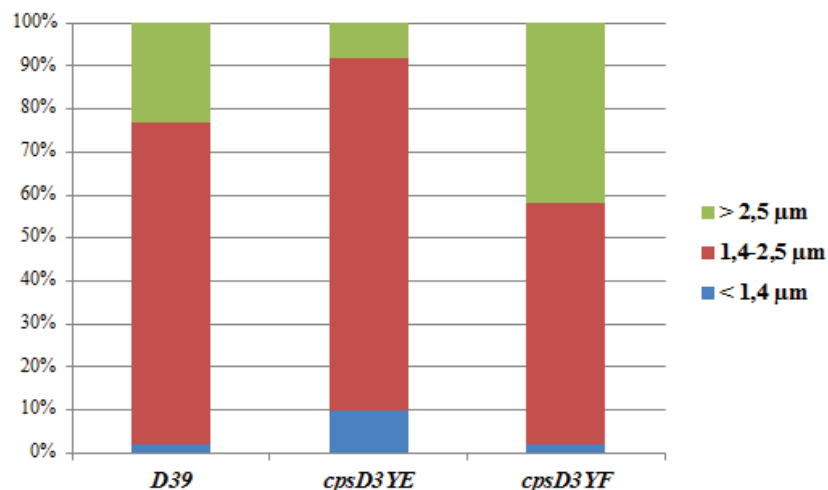


Figure 37 : Distribution de la longueur des cellules en fonction de l'état de phosphorylation de CpsD

Les cellules exprimant la forme non phosphorylée de CpsD (*cpsD3YF*) ont une plus grande proportion de cellules de grandes tailles alors que celles exprimant la forme phosphomimétique (*cpsD3YE*) sont plus petites.

L'ensemble de ces observations montre que si l'autophosphorylation de CpsD est nécessaire à une synthèse normale de CPS au septum, son absence induit une élongation des cellules du pneumocoque

II.7 La constriction de la cellule dépend de l'état de phosphorylation de CpsD

Pour analyser plus en détail les défauts cellulaires engendrés par l'élongation cellulaire, nous avons visualisé l'ultrastructure de nos mutants par microscopie électronique à transmission (**Fig. 38**). De nombreuses optimisations de protocole ont été nécessaires à l'utilisation de cette technique afin de stabiliser la capsule polysaccharidique de nos différents mutants (cf. § I.4.ii). Dans un premier temps, nous observons que les CPS sont présents tout autour des cellules exprimant la forme sauvage ou phosphorylée de CpsD (souches D39 et *cpsD3YE*) alors qu'ils ne sont présents qu'aux pôles bactériens des souches exprimant la forme non phosphorylée de CpsD (*cpsD3YF*) (**Fig. 38**). Ceci confirme les observations présentées dans les Figure 31 et 35. De manière plus intéressante, nous constatons également que les septa formés dans les souches exprimant la forme non phosphorylée de CpsD (*cpsD3YF*) sont abortifs. Ils semblent correctement positionnés mais bloqués et incapables de se fermer pour générer deux cellules filles (**Fig. 38**).

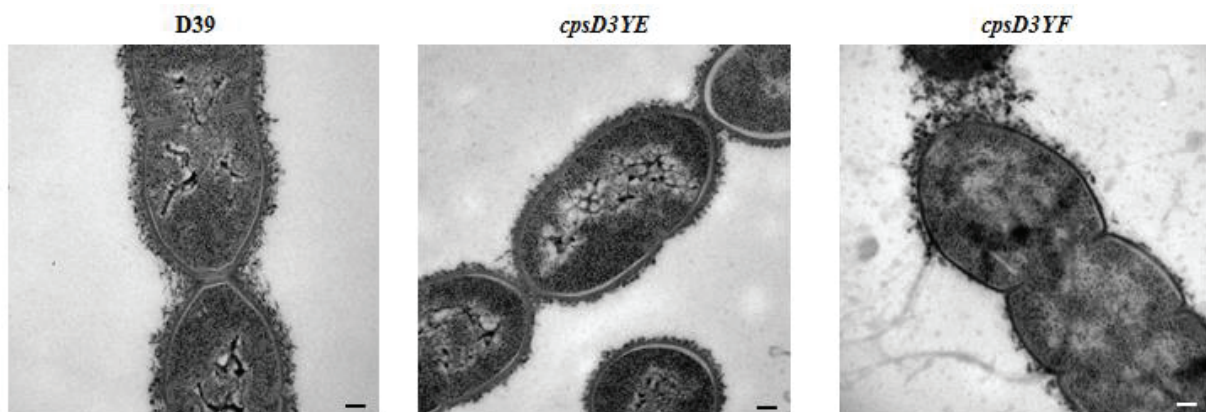


Figure 38 : Visualisation de l'ultrastructure bactérienne par microscopie électronique à transmission
La souche exprimant la forme non phosphorylée de CpsD (*cpsD3YF*) présente des défauts de capsule ainsi que des septa abortifs. Barres d'erreur = 0,1 μm

Ces observations suggèrent que l'autophosphorylation de CpsD puisse impacter l'assemblage et le positionnement de la protéine FtsZ qui forme un anneau permettant la constriction de la bactérie afin de donner deux cellules filles de taille identique. Nous avons donc observé par microscopie à fluorescence la localisation de FtsZ fusionnée à la GFP (**Fig. 39**). La fonctionnalité de la protéine FtsZ fusionnée à la GFP a été établie par suivi de la courbe de croissance de la souche D39 exprimant FtsZ-GFP (**Fig. 39C**) et immunomarquage *in vivo* des CPS produits (**Fig. 39D**). Dans la souche sauvage D39, ainsi que dans le mutant *cpsD3YE*, nous avons observé un positionnement normal de FtsZ au milieu de la cellule. De manière frappante, les anneaux de FtsZ se forment également dans les cellules allongées du mutant *cpsD3YF* et forment un profil en « rayure » (**Fig. 39A**). En effet, nous pouvons observer la présence de plusieurs bandes fluorescentes dans les cellules allongées suggérant que l'anneau FtsZ s'est correctement assemblé au site de division mais qu'il est incapable d'assurer la constriction de la cellule. En d'autres termes, le positionnement de FtsZ aux futurs sites de division aurait lieu alors même qu'il serait toujours positionné et bloqué au site de division du cycle cellulaire précédent. Afin de confirmer cette impression visuelle, nous avons réalisé une étude statistique de la distribution relative du positionnement de ces anneaux en fonction de la longueur de la bactérie à l'aide du logiciel MicrobeTracker® (**Fig. 39B**). Nous pouvons constater la présence de trois pics significatifs dans les souches sauvages et celles exprimant la forme phosphomimétique de CpsD. Ces pics correspondent à FtsZ au septum en cours de constriction (position 1/2) et à son repositionnement aux deux futurs septa (positions 1/3 et 2/3) des deux cellules filles. Dans la souche mutante exprimant CpsD3YF, la distribution relative des anneaux de FtsZ est plus diffuse et répartie tout le long de la cellule. Cependant, ces anneaux sont toujours majoritairement localisés et formés aux positions 1/3, 1/2 et 2/3. Ces observations montrent que la phosphorylation de CpsD n'impacte pas le positionnement de FtsZ et son assemblage en anneau. Par contre, l'anneau de FtsZ est bloqué et incapable d'induire la constriction de la cellule dans laquelle CpsD ne peut pas être phosphorylée.

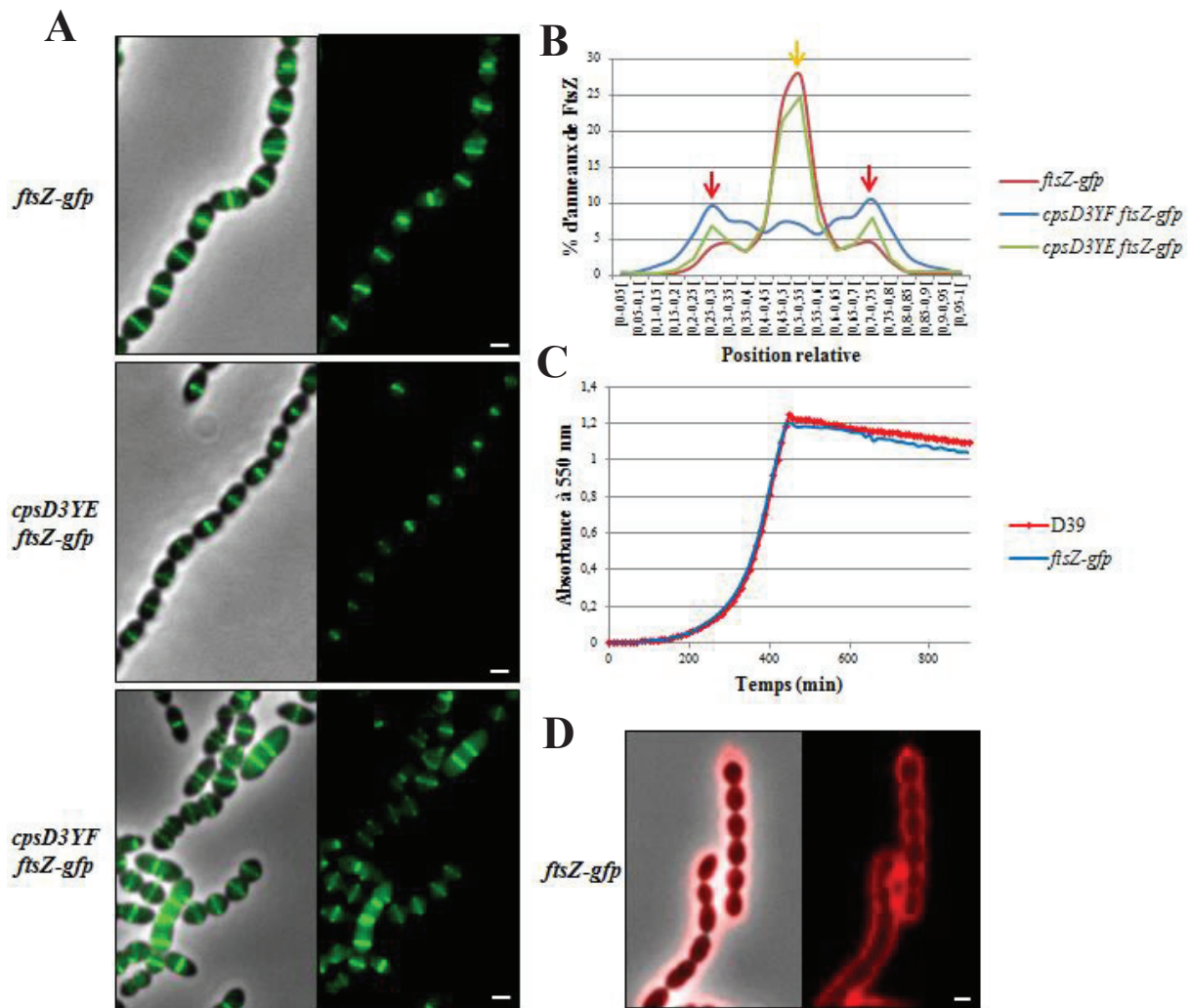


Figure 39 : Analyse de la localisation de la protéine FtsZ

(A) Les images de gauche correspondent au contraste de phase superposé au signal fluorescent détecté alors que celles de droite correspondent au signal de fluorescence seul. L'anneau de FtsZ se forme correctement dans tous les mutants. Cependant, son incapacité à se fermer dans la souche exprimant la forme non phosphorylée de CpsD (*cpsD3YF*) conduit à une multiplication de ces anneaux. (B) Etude statistique de la position relative des anneaux de FtsZ en fonction de la longueur de la bactérie. Les flèches rouges correspondent aux positions 1/3 et 2/3 alors que la flèche orange indique la position 1/2. Malgré leur multiplication, les anneaux de FtsZ formés dans les souches exprimant la forme non phosphorylée de CpsD semblent être correctement localisés. (C) Courbes de croissance réalisées sur la souche sauvage (D39) et le mutant *ftsZ-gfp*. Ces deux courbes se superposent parfaitement. (D) Immunomarquage *in vivo* des CPS produits dans la souche *ftsZ-gfp*. L'image de gauche correspond au contraste de phase superposé au signal fluorescent détecté alors que celle de droite correspond au signal de fluorescence seul. Les CPS sont présents tout autour de la bactérie comme dans une souche sauvage (Fig. 31). Barres d'échelle = 1 μ m

II.8 La ségrégation de l'ADN chromosomique dépend de l'état de phosphorylation de CpsD

Dans le but de comprendre pourquoi les cellules exprimant CpsD3YF sont bloquées en septation, nous avons analysé la localisation de l'ADN chromosomique de ces bactéries (**Fig. 40**). Pour ce faire, les membranes plasmiques ont été colorées à l'aide du colorant FM4-64 et le colorant DAPI a été utilisé pour visualiser l'ADN chromosomique. L'ADN chromosomique des cellules exprimant la forme non-phosphorylée de CpsD (CpsD3YF) est diffus et semble occuper l'ensemble du cytoplasme de la bactérie (**Fig. 40**). Ces observations suggèrent que ce défaut de localisation du chromosome pourrait être responsable de l'allongement des cellules.

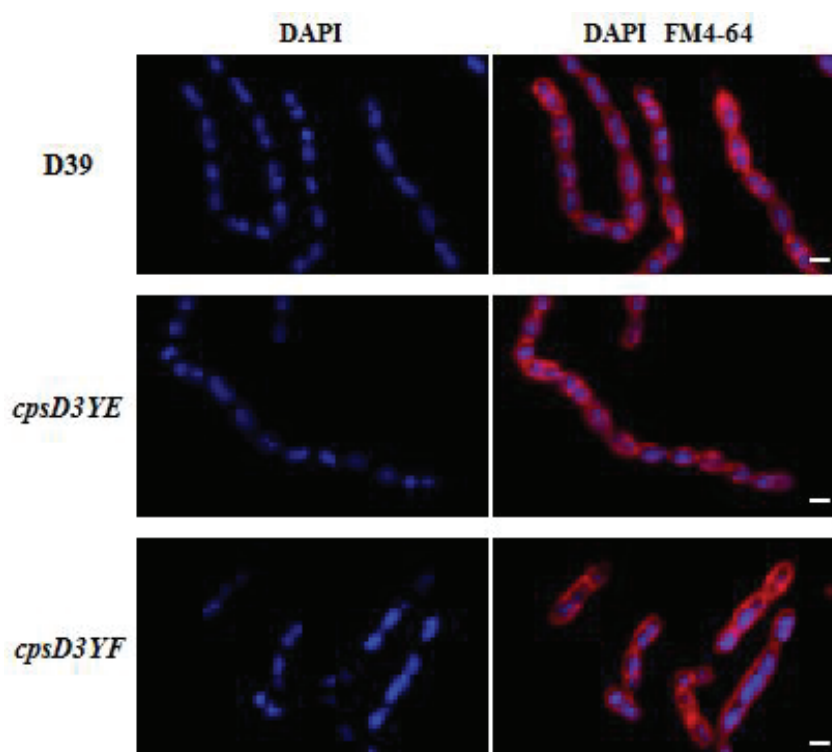


Figure 40 : Localisation de l'ADN chromosomique

Les images de gauche correspondent au signal de DAPI (bleu), permettant de colorer l'ADN chromosomique, alors que celles de droites correspondent à la superposition de ce signal et de celui obtenue à l'aide du colorant FM4-64 (rouge), permettant de colorer la membrane plasmique. Une élongation des cellules et de l'ADN est observée chez le mutant exprimant la forme phosphoablative de CpsD (*cpsD3YF*). Barres d'échelle = 1µm

Afin d'analyser de façon plus rigoureuse et statistique les défauts d'ADN chromosomique observés, nous avons étudié, en collaboration avec l'équipe du Dr. Veening de l'Université de

Groningen aux Pays-Bas, la localisation d'une protéine se liant à l'ADN, la protéine HlpA (« Histone-like protein A »), fusionnée à la RFP (**Tab. 5**). Les cellules observées ont été classées selon le profil de distribution de leur ADN chromosomique. Ainsi, les cellules en début de cycle cellulaire contenant un nucléoïde condensé ainsi que les cellules en cours de cycle cellulaire contenant deux nucléoïdes sont considérées comme caractéristiques d'un processus de division normal. On peut remarquer que plus de 90 % des cellules possèdent cette distribution du nucléoïde dans la souche sauvage et la souche *cpsD3YE*. De manière frappante, ce pourcentage descend en dessous de 70 % dans le mutant *cpsD3YF* suggérant que la réplication et la séparation des deux chromosomes fils sont impactées. Cette observation est renforcée par l'augmentation du nombre de cellules présentant un défaut des nucléoïdes (allongé, diffus voire absent). En effet, ce défaut est observé dans 30 % des cellules exprimant *cpsD3YF* alors qu'il est retrouvé uniquement dans 6.3 % et 4.3% des cellules sauvages ou exprimant *cpsD3YE*, respectivement.

Pourcentage de cellules avec :					
	1 nucléoïde/ cellule	2 nucléoïdes/ cellule	Nucléoïde allongé	Nucléoïde non condensé	Pas de nucléoïde
D39	83,7	10	5,7	0,3	0,3
	93,7		6,3		
<i>cpsD3YE</i>	91,4	4,3	3,6	0	0,7
	95,7		4,3		
<i>cpsD3YF</i>	58,7	11,1	27	1,6	1,6
	69,8		30,2		


HlpA-rfp 

Tableau 5 : Analyse des défauts de conformation de l'ADN chromosomique

La présence d'un ou de deux nucléoïdes par cellules est considérée comme un état normal. Les nucléoïdes allongés, non condensés ou absent sont considérés comme anormaux. Les nombres en rouge et vert correspondent à la somme des états normaux ou anormaux. 30 % des cellules exprimant la forme phosphoablative de CpsD présentent des défauts de conformation de l'ADN chromosomique.

L'ensemble de ces données montre que l'autophosphorylation de CpsD n'est pas nécessaire à la localisation de l'anneau de FtsZ au septum de division mais qu'elle est requise

pour la constriction de celui-ci. De plus, cette autophosphorylation est nécessaire à la réplication et/ou à la ségrégation de l'ADN chromosomique dans les deux cellules filles. Cette dernière observation montre que l'autophosphorylation de CpsD pourrait intervenir dans la ségrégation du chromosome qui, s'il est mal ségrégué, pourrait créer un phénomène d'exclusion du nucléoïde artificiel bloquant la constriction de l'anneau FtsZ et induisant l'allongement des cellules.

II.9 CpsD agit sur la mobilité de la protéine ParB

Afin de tester notre hypothèse et visualiser si l'absence de phosphorylation de CpsD agit négativement sur la ségrégation des chromosomes, nous avons construit une souche dans laquelle nous pouvons suivre la localisation de CpsD en même temps que celle de ParB (**Fig. 41**). Pour cela, CpsD est fusionnée à la RFP et ParB à la GFP. La fonctionnalité de ces deux protéines fusionnées à des protéines fluorescentes a été contrôlée par le suivi de la croissance bactérienne de cette souche (**Fig. 41B**) ainsi que par la présence de CPS à sa surface par immunomarquage *in vivo* (**Fig. 41C**). Comme expliqué dans l'exposé bibliographique (cf § III.3), ParB est une protéine se liant à l'origine de réplication de l'ADN chromosomique au niveau des sites *parS*. Bien que les mécanismes sous-jacents demeurent méconnus, cette protéine est reconnue comme intervenant dans la ségrégation des chromosomes. Nous avons donc suivi la localisation de CpsD et ParB dans la cellule vivante par microscopie « time-lapse » en prenant des images toutes les 5 min. Comme cela a déjà été décrit, CpsD se localise au septum bactérien (Henriques *et al.*, 2011) et ParB est localisée au niveau du futur septum (Minnen *et al.*, 2011) (**Fig. 41A**). Cependant, nous pouvons constater qu'au cours du cycle cellulaire, CpsD commence à se déplacer au futur septum avant la fin de la constriction. De plus, l'arrivée de CpsD au futur septum coïncide avec la migration des protéines ParB en direction du septum suivant (**Fig. 41A**). Ainsi, il semblerait qu'il y ait un lien entre la migration de ParB et celle de CpsD. Ces observations suggèrent que l'arrivée de CpsD au septum de division pourrait servir de signal pour initier la ségrégation des chromosomes fils.

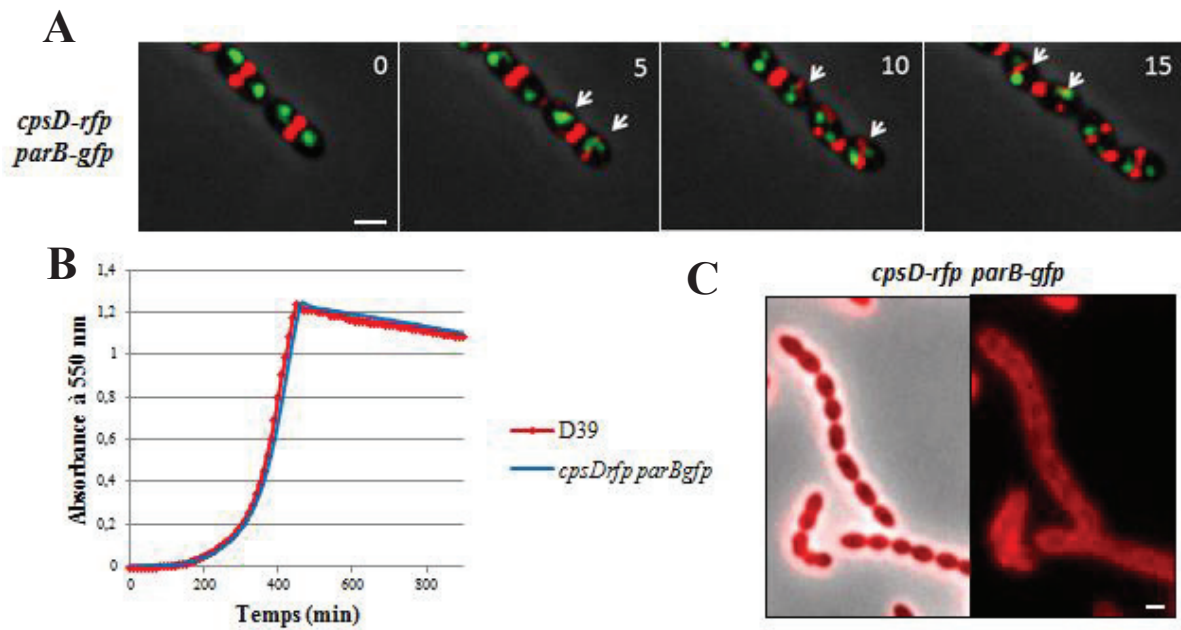


Figure 41 : Dynamique de la localisation de CpsD et ParB

(A) CpsD (en rouge) est localisée au septum en cours tandis que ParB (en vert) est localisée aux futurs septa. Au cours du cycle cellulaire, CpsD migre vers le futur septum avant que la constriction bactérienne ne soit terminée et ParB commence à migrer vers le septum suivant après l'arrivée de CpsD. (B) Courbes de croissance réalisées sur la souche sauvage (D39) et le mutant *cpsD-rfp parB-gfp*. (C) Immunomarquage *in vivo* des CPS produits dans la souche *cpsD-rfp parB-gfp*. L'image de gauche correspond au contraste de phase superposé au signal fluorescent détecté alors que celle de droite correspond au signal de fluorescence seul. Les CPS sont présents tout autour de la bactérie comme dans une souche sauvage (Fig. 31). Barres d'échelle = 1 μ m

Pour valider cette hypothèse, nous avons réalisé, en collaboration avec le Dr. Veening de l'Université de Groningen aux Pays-Bas, une analyse de la mobilité de ParB dans nos différents mutants (Fig. 42). Pour ce faire, nous avons utilisé une technique de microscopie haute résolution, la microscopie à fluorescence à réflexion interne totale (TIRF). Cette approche nous a permis de visualiser que, dans le mutant exprimant la forme non phosphorylée de CpsD (*cpsD3YF*), la protéine ParB est moins mobile que dans la souche sauvage (D39) alors que sa mobilité est augmentée dans la souche exprimant la forme phosphomimétique de CpsD (*cpsD3YE*) (Fig. 42). Ces observations montrent que l'autophosphorylation de CpsD intervient dans la mobilité de la protéine ParB et sont donc cohérentes avec notre hypothèse proposant que CpsD, en fonction de son état de phosphorylation, impacte la ségrégation de l'ADN chromosomique.

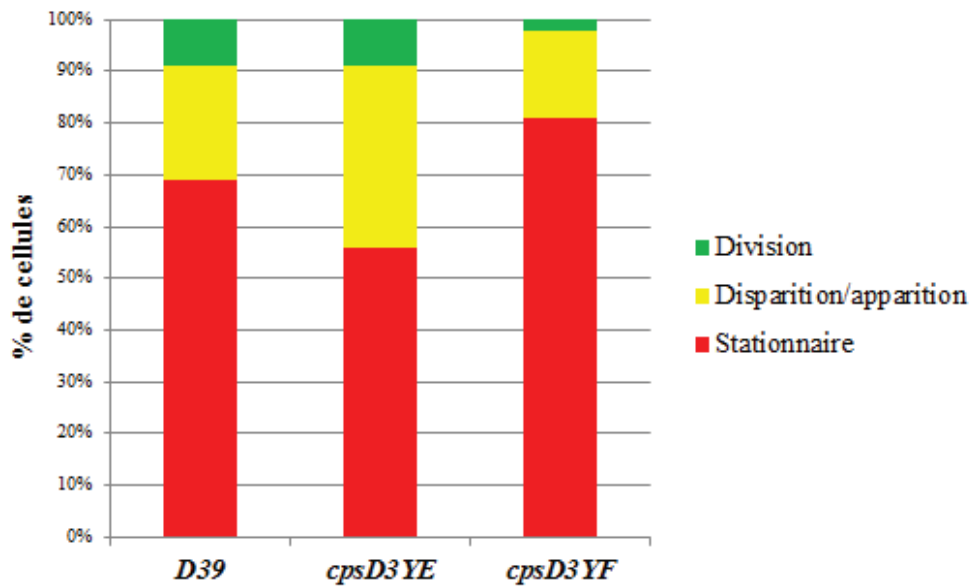


Figure 42 : Contrôle de la mobilité de ParB

La mobilité de ParB dans nos différents mutants a été contrôlée *in vivo* par microscopie haute résolution à réflexion interne totale. ParB est moins mobile dans la souche exprimant la forme phosphoablative de CpsD alors qu'il est plus mobile en présence de la forme phosphomimétique de CpsD

II.10 CpsD interagit avec la protéine ParB

Il est intéressant de noter que les BY-kinases appartiennent à la famille des protéines à P-loop de type Mrp/MinD dans laquelle on retrouve les protéines MinD, nécessaire à la localisation de l'anneau de FtsZ, et ParA, impliquée dans la ségrégation des chromosomes *via* la protéine ParB (Leipe *et al.*, 2002). Au vu des résultats obtenus, un modèle structural de CpsD, réalisée par le Pr. Nessler de l'Université Paris-Sud à l'aide de la structure de CapA1_{cyto}B2 (Olivares *et al.*, 2008), a été comparé à la structure de ParA obtenue chez *Thermus thermophilus* (Leonard *et al.*, 2005). Cette approche a permis de confirmer que CpsD est un homologue structural de la protéine ParA (Fig. 43).

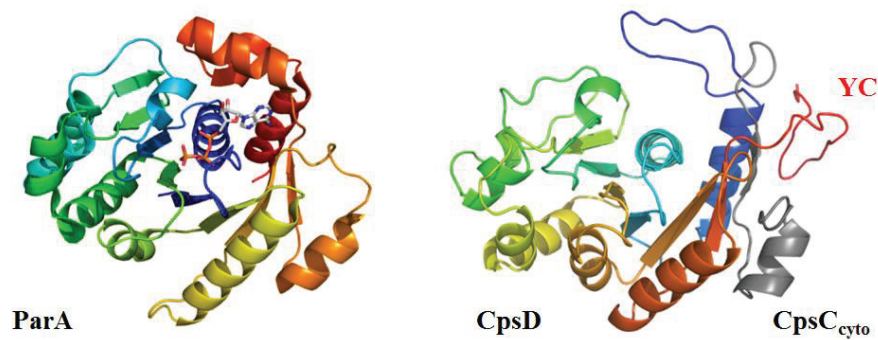


Figure 43 : Comparaison de la structure cristallographique de ParA (2BEK) avec la modélisation structurale de CpsC_{cyto}-CpsD

A partir de là, nous avons imaginé que CpsD pourrait utiliser cette ressemblance avec les protéines ParA pour moduler la fonction de ParB dans la ségrégation des chromosomes fils. Nous avons donc, dans un premier temps, testé si CpsD, comme les protéines ParA, pouvait interagir avec l'ADN de manière aspécifique (**Fig. 44**). Pour cela, nous avons utilisé deux stratégies. La première est une stratégie *in vitro* dans laquelle nous avons testé la capacité de CpsD à interagir avec un fragment d'ADN de 700 pb. La seconde est une stratégie *in vivo* consistant en la surexpression de CpsD fusionnée à la GFP chez *E. coli*. Les bactéries obtenues sont ensuite traitées au colorant DAPI afin de voir si CpsD colocalise avec le nucléoïde. Ces deux expériences n'ont pas permis de démontrer que CpsD était capable d'interagir aspécifiquement avec l'ADN car aucun retard de migration du fragment d'ADN ni aucune colocalisation entre CpsD et le nucléoïde d'*E. coli* n'ont été observés (**Fig. 44**).

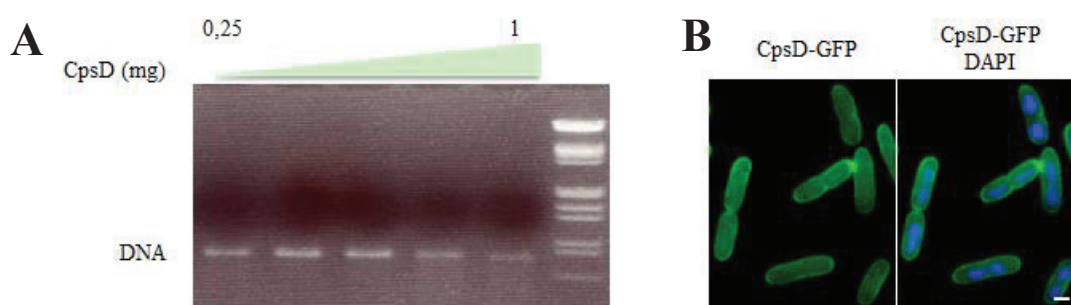


Figure 44 : CpsD n'interagit pas avec l'ADN

(A) Test d'interaction *in vitro* à l'aide d'un fragment PCR de 700 pb. Aucune modification de la migration de ce fragment n'est observée. (B) Test d'interaction *in vivo* chez *E. coli*. L'image de gauche correspond au signal fluorescent détecté à l'aide de la fusion CpsD-GFP (vert) alors que celle de droite correspond à la superposition de ce signal avec celui obtenue par la coloration de l'ADN chromosomique à l'aide du DAPI (bleu). CpsD ne colocalise pas avec le nucléoïde. Barres d'échelle = 1 μ m

Dans un second temps, la capacité de CpsD à interagir avec ParB a été testée. Nous avons tout d'abord testé cette interaction par thermophorèse, en collaboration avec le Dr Morlot de l'IBS à Grenoble (**Fig. 45**). Nous avons utilisé la chimère CpsC_{cyto}-CpsD de la souche TIGR4 qui possède une meilleure solubilité et stabilité dans nos conditions de purification. ParB a été marquée à l'aide d'un fluorophore afin de suivre sa mobilité sous l'effet de la chaleur. Nous avons alors comparé l'interaction de ParB avec la chimère CpsC_{cyto}-CpsD et une chimère CpsC_{cyto}-CpsD4YF pour laquelle les résidus tyrosyles du cluster de tyrosines sont mutés en phénylalanines mimant ainsi un état non-phosphorylé de la protéine. Nous avons observé que CpsC_{cyto}-CpsD et ParB était capable d'interagir directement avec un K_D de $3,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (**Fig. 45A**). De plus nous avons constaté qu'en absence de phosphorylation, l'affinité entre ces deux protéines diminuait. En effet, CpsC_{cyto}-CpsD4YF et ParB sont toujours capables d'interagir ensemble mais avec une affinité sept fois plus faible ($K_D = 23,7 \pm 0,8 \mu\text{M}$) (**Fig. 45B**). Ainsi, il semblerait que, comme ParA, CpsD soit capable d'interagir avec ParB et que cette interaction serait modulée par l'état de phosphorylation de CpsD. A ce jour, ces expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois et devront être reproduites.

Afin de confirmer ces observations *in vivo*, nous avons construit différentes souches de pneumocoque dans lesquelles CpsD et ses formes mutées, CpsD3YE et CpsD3YF, sont fusionnées à une étiquette 6-histidines et ParB est fusionnée à la GFP. Un extrait protéique total est préparé à partir d'une culture de ces bactéries et la protéine ParB est immuno-précipitée par un anticorps anti-GFP. Les fractions obtenues ont ensuite été analysées par SDS-PAGE et immuno-révélées par des anticorps anti-6His après électrotransfert du gel sur une membrane de PVDF (**Fig. 46**). Cette expérience permet donc de voir si CpsD est co-purifiée avec ParB. Nous avons observé que CpsD est spécifiquement capable d'interagir *in vivo* avec ParB et que cette interaction est dépendante de l'état de phosphorylation de CpsD. En effet, on peut noter que CpsD est co-purifiée en plus grande quantité lorsqu'elle est sous sa forme phosphomimétique (CpsD3YE) (**Fig. 46**).

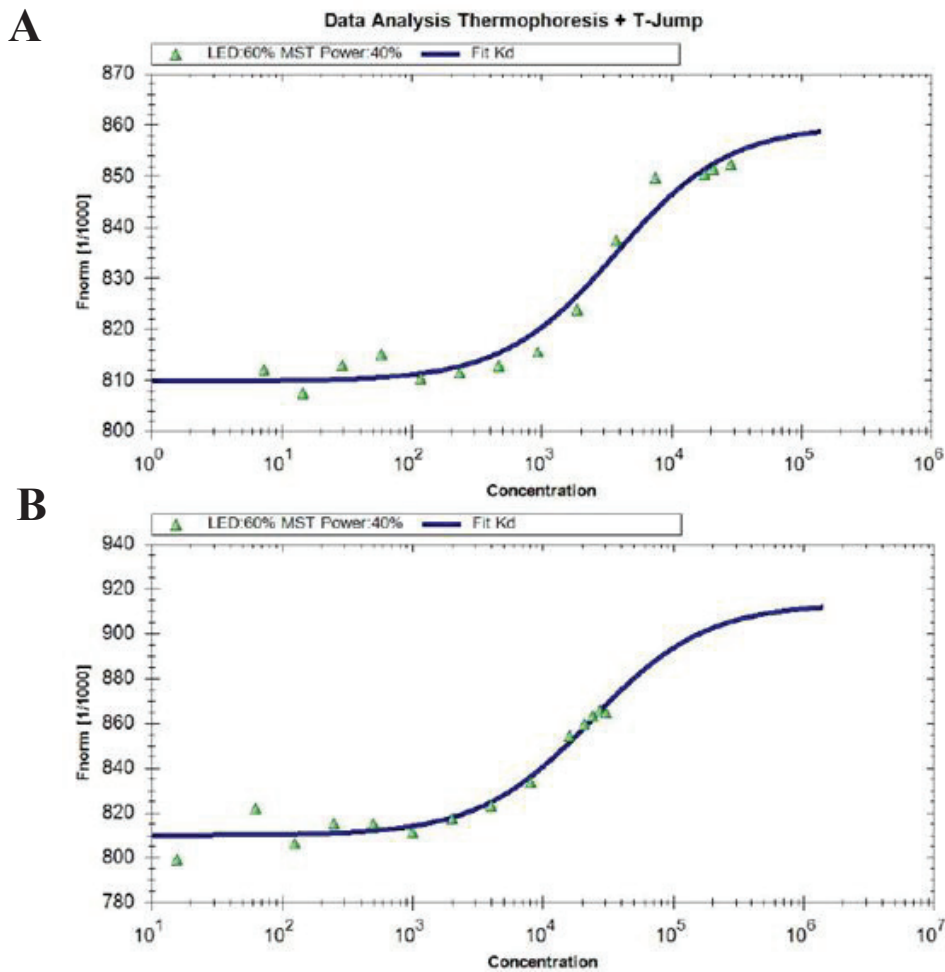


Figure 45 : CpsD interagit avec ParB de manière phosphorylation dépendante

Mesures d'affinité de ParB contre des concentrations croissantes des chimères CpsC_{cyto}-CpsD (A) et CpsC_{cyto}-CpsD4YF (B) de la souche TIGR4 du pneumocoque. F_{norm} : fluorescence normalisée (fluorescence après thermophorèse/fluorescence initiale). Les concentrations des chimères sont rapportées sur l'axe des abscisses et sont exprimées en nM. ParB et CpsC_{cyto}-CpsD interagissent avec un K_D de 3,7 +/- 0,2 μM alors que ParB interagit avec CpsC_{cyto}-CpsD4YF avec un K_D de 23.7 +/- 0,8 μM soit une affinité sept fois inférieure.

L'ensemble de ces observations montre que CpsD ne possède pas toutes les propriétés des protéines ParA. Cependant, son homologie structurale avec ParA est vraisemblablement à la base de son interaction avec ParB. De plus, nous montrons que cette interaction est modulée *in vitro* et *in vivo* par la phosphorylation de CpsD. Ces données sont donc cohérentes avec les défauts de mobilité de la protéine ParB (Fig. 42) dans le mutant exprimant la forme non-phosphorylée de CpsD. Il peut être proposé que le pneumocoque ait pu développer un mécanisme original permettant de coordonner la synthèse de la capsule polysaccharidique à la ségrégation des chromosomes. En effet, lorsque la machinerie de production de la capsule est active, CpsD

est autophosphorylée. Elle peut alors signaler à ParB d'initier la ségrégation des chromosomes. A l'inverse, quand CpsD n'est pas phosphorylée, son interaction avec ParB est affectée et résulte dans une mobilité réduite de ParB. Cette dernière serait à l'origine d'une ségrégation des chromosomes moins efficace générant un phénomène d'exclusion du nucléoïde et donc un retard de septation conduisant à l'allongement des cellules.

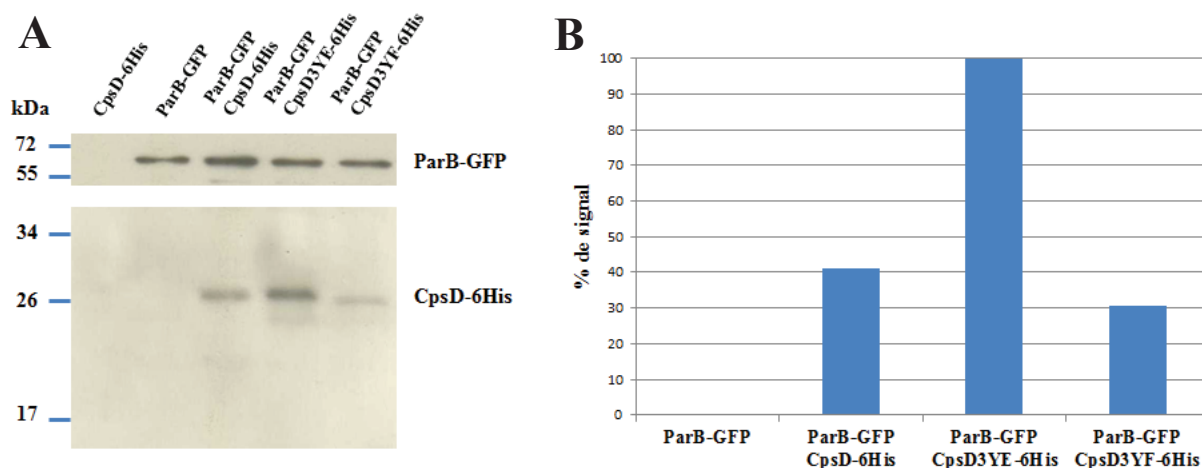


Figure 46 : Co-purification de CpsD et ParB

(A) La présence de CpsD est visualisée grâce à un anticorps dirigé contre l'étiquette 6-histidines. La quantité de ParB purifiée est contrôlée à l'aide d'un anticorps anti-GFP. CpsD est co-purifiée avec la protéine ParB. Cette co-purification est plus efficace lorsque CpsD est dans sa forme phosphomimétique (CpsD3YE). (B) Quantification des signaux de co-purification de CpsD et ParB. Ce graphique illustre le ratio de signal CpsD/ParB. Le ratio obtenu pour l'interaction CpsD3YE/ParB est considéré comme 100 %.

II.11 La virulence du pneumocoque dépend de l'état de phosphorylation de CpsD

La production de capsule et la capacité à se diviser sont deux éléments indispensables à une infection réussie de l'hôte par le pneumocoque. Nous avons étudié les conséquences de la phosphorylation et déphosphorylation de CpsD dans la virulence du pneumocoque. Pour ce faire, le modèle d'infection *Galleria mellonella* (Evans et Rozen, 2012) a été infecté par nos différents mutants. Les contrôles d'infections ont été réalisés soit avec la souche pathogène D39 sauvage, soit avec la souche de laboratoire R800 ne produisant pas de capsule (**Fig. 47**). La première souche conduit à une mort de 50 % des larves en 24 h alors que ce taux de mortalité n'est pas atteint après 144 h avec la souche R800. Ce résultat est également obtenu avec la souche $\Delta cpsD$ qui n'exprime pas correctement la capsule tout autour de la cellule. Nous avons également observé que l'expression de la forme phosphomimétique de CpsD, qui conduit à une production

normale de capsule et qui n'affecte pas la division du pneumocoque, n'impacte pas la virulence du pneumocoque même s'il semble que la mort des larves surviennent moins rapidement au cours des cents premières heures post-infection. A l'inverse, l'expression de la forme non-phosphorylée de CpsD affecte la virulence du pneumocoque et induit la mortalité de moins de 40 % des larves à 144 h post-infection. Il est raisonnable de proposer que la septation réduite des cellules et la production altérée de capsule sont directement responsables de ce défaut de virulence.

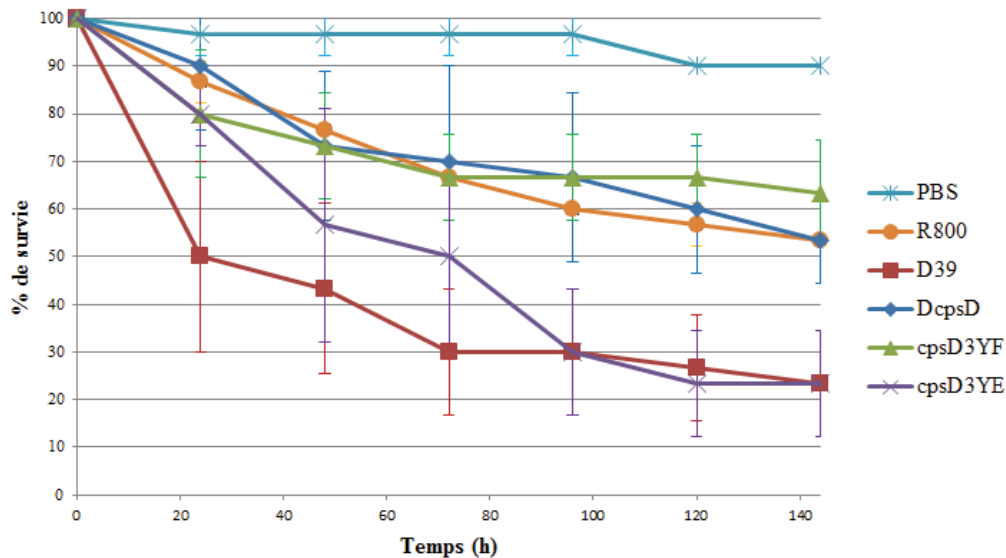


Figure 47 : Test de virulence sur *Galleria mellonella*

Représentation du taux de survie des larves en fonction du temps après infection. Les barres d'erreur représentent l'écart moyen à la moyenne obtenu grâce à la réalisation en triplicat de l'infection de dix larves. Les mutants $\Delta cpsD$ et $cpsD3YF$ se comportent comme la souche non virulente R800 alors que le mutant $cpsD3YE$ conduit au même taux de mortalité que la souche sauvage. Cependant, il semblerait que la mortalité des larves après infections par ce mutant soit plus lente.

**Analyse comparative de l'activation des
tyrosine-kinases CapB1 et CapB2 par leurs
modulateurs transmembranaires CapA1 et
CapA2 chez *Staphylococcus aureus***

Chez *S. aureus*, deux BY-kinases (CapB1 et CapB2) ainsi que deux modulateurs transmembranaires (CapA1 et CapA2) ont été identifiés (Soulat *et al.*, 2006). CapA1 et CapB1 sont codées par des gènes appartenant à l'opéron *cap* codant pour des protéines intervenant dans la synthèse et l'export des polysaccharides capsulaires alors que les gènes codant pour CapA2 et CapB2 se trouvent ailleurs dans le génome. Malgré le fait que ces deux BY-kinases partagent plus de 70 % de similarité de séquence, seule CapB2 possède la capacité à s'autophosphoryler *in vitro*. CapA1 et CapA2 possèdent également une similarité de séquence élevée (72 % d'identité sur l'extrémité C-terminale). De plus, le résidu phénylalanyle permettant la fixation du nucléotide est conservé en dernière (CapA2) ou avant-dernière position (CapA1). Cependant, il a été montré que l'activation de l'autophosphorylation de CapB2 était plus efficace en présence de CapA1 qu'en présence de son modulateur associé CapA2 (Soulat *et al.*, 2006).

Afin de comprendre les différences entre ces observations, nous avons résolu, en collaboration avec l'équipe du Pr. Nessler de l'Université Paris-Sud, les structures cristallographiques des chimères CapA1_{cyto}B1 et CapA2_{cyto}B2. La comparaison de ces structures avec celle de CapA1_{cyto}B2, obtenue lors d'une précédente étude (Olivares-Illana *et al.*, 2008), nous a permis d'identifier quelques différences structurales qui pourraient expliquer l'absence d'activité kinase de CapB1 ou encore la différence d'activité de CapB2 en présence de CapA1 et de CapA2.

Dans un premier temps, nous avons étudié la raison pour laquelle le modulateur transmembranaire CapA2 stimulait l'autophosphorylation de CapB2 avec moins d'efficacité que le modulateur CapA1. Lors de l'étude réalisée sur la chimère CapA1_{cyto}B2, il a été montré que la fixation de l'ATP était stabilisée par la présence du résidu phénylalanyle en avant dernière position de CapA1. Ce résidu est conservé dans CapA2 mais se situe en dernière position. La diminution de l'efficacité de CapA2 à activer l'autophosphorylation de CapB2 pourrait donc être expliquée par l'absence du dernier résidu asparaginyle de CapA1 qui interagit avec l'extrémité N-terminale de CapB2. En effet, ce résidu interagit avec le résidu asparaginyle en position 3 de CapB2 et forme des liaisons hydrogènes avec les chaînes principales des résidus 1 et 2 de CapB2. L'ensemble de ces interactions conduit à la formation d'une plateforme permettant l'interaction avec les résidus tyrosyles phosphorylables.

Afin de confirmer l'importance de ce résidu asparaginyle, nous avons produit le fragment C-terminal de CapA1 sans ce résidu puis nous avons testé sa capacité à activer l'autophosphorylation de CapB2. Nous l'avons également comparé à celle induite par le fragment C-terminal de CapA1. Malheureusement cette délétion n'affecte pas la capacité de CapB2 à s'autophosphoryler *in vitro*. De plus, l'ajout d'un résidu asparaginyle à la fin de CapA2 n'est pas suivi d'effet. Bien que ces observations ne permettent pas d'expliquer la différence de comportement de CapB2 vis-à-vis de ces deux modulateurs transmembranaires, on ne peut pas exclure qu'une protéine intermédiaire puisse intervenir *in vivo* dans l'activation de CapB2 par CapA2. De plus, les extrémités N-terminales de ces modulateurs sont également cytoplasmiques et n'ont jamais été étudiées. Ces extrémités pourraient ainsi intervenir dans ces mécanismes de régulation. Enfin, on ne peut pas exclure le fait que la faible activation de CapB2 par CapA2 n'ait aucune pertinence physiologique.

Dans un second temps, nous avons étudié le fait qu'aucune activation de l'autophosphorylation de CapB1 n'ait été détectée que ce soit en présence de CapA1 comme de CapA2 (Soulat *et al.*, 2006). Lors de l'analyse de la structure cristallographique de la chimère CapA1_{cyto}B1 nous avons observé que, malgré son incapacité à s'autophosphoryler, cette chimère était incapable de former la structure octamérique observée avec la chimère CapA1_{cyto}B2 non phosphorylée. Cette oligomérisation est réalisée à l'aide de deux motifs. Le premier, le domaine conservé EX₂RX₂R, permet de réaliser des liaisons hydrogènes avec la protéine voisine (Jadeau *et al.*, 2008) et est essentiel à la transphosphorylation des BY-kinases. Le deuxième domaine intervenant dans cette interaction n'est autre que le cluster de tyrosines. Les résidus impliqués dans la fixation du cluster de tyrosines chez CapB2 sont tous conservés dans CapB1 à l'exception de quelques résidus de l'extrémité N-terminale tels que l'arginine 5 et l'asparagine 3 respectivement remplacées par un glutamate et une lysine. L'altération de ces résidus intervenant à la fois dans l'interaction avec le cluster de tyrosines et avec le modulateur transmembranaire pourrait donc expliquer l'absence d'activité kinase observée avec CapB1.

Afin de tester cette hypothèse nous avons inversé ces fragments dans CapB1 et CapB2 puis nous avons testé la capacité de ces nouvelles protéines à s'autophosphoryler, ou à phosphoryler différents substrats. Ces mutations n'ont pas permis de restaurer une activité kinase à CapB1 ni d'annihiler celle de CapB2. Cette observation montre que ces résidus n'ont pas un

rôle essentiel dans l'activité des BY-kinases comme les structures cristallographiques le suggéraient.

L'ensemble de ces résultats conduit à la question du rôle biologique des couples de protéines homologues CapA1/B1 et CapA2/B2. La réponse à cette question est alors discutée avec un exposé des différentes interprétations possibles et notamment que CapB1 pourrait représenter le premier exemplaire de pseudo-tyrosine-kinase bactérienne.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. Sylvie Nessler de l'Université Paris-Sud et mon travail a principalement consisté au clonage, à la mutagenèse et à la purification des protéines et/ou domaines nécessaires et à la réalisation des tests de phosphorylation pour évaluer l'importance de différents acides aminés pointés par l'analyse par cristallographie.

Comparative Analysis of the Tyr-Kinases CapB1 and CapB2 Fused to Their Cognate Modulators CapA1 and CapA2 from *Staphylococcus aureus*

Jakub Gruszczyk¹^{‡a}, Vanesa Olivares-Illana¹^{‡b}, Julien Nourikyan²[§], Aurore Fleurie², Emmanuelle Béchet², Virginie Gueguen-Chaignon^{1,2}, Céline Freton², Magali Aumont-Nicaise³, Solange Moréra¹, Christophe Grangeasse^{2*}, Sylvie Nessler^{1,3*}

1 Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales (LEBS), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Gif sur Yvette, France, **2** Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), CNRS/Université Claude Bernard Lyon 1 (UCBL), Lyon, France, **3** Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire (IBBMC), Université Paris-Sud/CNRS, Orsay, France

Abstract

A particular class of tyrosine-kinases sharing no structural similarity with eukaryotic tyrosine-kinases has been evidenced in a large array of bacterial species. These bacterial tyrosine-kinases are able to autophosphorylate on a C-terminal tyrosine-rich motif. Their autophosphorylation has been shown to play a crucial role in the biosynthesis or export of capsular polysaccharide. The analysis of the first crystal structure of the staphylococcal tyrosine kinase CapB2 associated with the activating domain of the transmembrane modulator CapA1 had brought conclusive explanation for both the autophosphorylation and activation processes. In order to explain why CapA1 activates CapB2 more efficiently than its cognate transmembrane modulator CapA2, we solved the crystal structure of CapA2B2 and compared it with the previously published structure of CapA1B2. This structural analysis did not provide the expected clues about the activation discrepancy observed between the two modulators. *Staphylococcus aureus* also encodes for a CapB2 homologue named CapB1 displaying more than 70% sequence similarity and being surprisingly nearly unable to autophosphorylate. We solved the crystal structure of CapA1B1 and carefully compare it with the structure of CapA1B2. The active sites of both proteins are highly conserved and the biochemical characterization of mutant proteins engineered to test the importance of small structural discrepancies identified between the two structures did not explain the inactivity of CapB1. We thus tested if CapB1 could phosphorylate other protein substrates or hydrolyze ATP. However, no activity could be detected in our *in vitro* assays. Taken together, these data question about the biological role of the homologous protein pairs CapA1/CapB1 and CapA2/CapB2 and we discuss about several possible interpretations.

Citation: Gruszczyk J, Olivares-Illana V, Nourikyan J, Fleurie A, Béchet E, et al. (2013) Comparative Analysis of the Tyr-Kinases CapB1 and CapB2 Fused to Their Cognate Modulators CapA1 and CapA2 from *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE 8(10): e75958. doi:10.1371/journal.pone.0075958

Editor: Claudio M. Soares, Instituto de Tecnológica Química e Biológica, UNL, Portugal

Received: May 17, 2013; **Accepted:** August 19, 2013; **Published:** October 11, 2013

Copyright: © 2013 Gruszczyk et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the CNRS, the University of Lyon, the Association pour la Recherche sur le Cancer and the Agence National de la Recherche (ANR 2010 BLAN 1303 03 and ANR-07-JCJC0125-01) and the Association pour la Recherche sur le Cancer. V. O-I. was funded by the French research minister. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: c.grangeasse@ibcp.fr (CG); sylvie.nessler@u-psud.fr (SN)

^{‡a} Current address: Infection & Immunity Division, Walter and Eliza Hall Institute, Victoria, Australia

^{‡b} Current address: Laboratorio de Interacciones Biomoleculares y Cancer, Instituto de Física, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

§ These authors contributed equally to this work.

Introduction

A new family of protein tyrosine-kinases harboring a P-loop type nucleotide binding-domain [1] with a Walker A motif [2] has been described. They have been called BY-kinases (Bacterial-tyrosine-kinases) as they are only found in bacterial genomes [3,4]. They have been proposed to participate in the regulation of several cellular processes but to date, their best-documented cellular function concerns capsular polysaccharide synthesis in which they act as co-polymerase in the multiprotein capsule assembly machinery [5]. BY-kinase autophosphorylation on a C-terminal tyrosine cluster, called Y-cluster [6] is crucial in regulating polysaccharide export. BY-kinases are also able to phosphorylate various endogenous substrates [7] among which

proteins involved in polysaccharide precursor synthesis [8,9]. For example, in *S. aureus*, the BY-kinase CapB2 has been shown to phosphorylate the UDP-N-acetyl-mannosamine dehydrogenase CapO on residue Tyr89, thus triggering its activity [10,11]. Collectively, BY-kinase autophosphorylation and ability to phosphorylate polysaccharide-synthesizing enzymes represent a key regulatory tool of capsular polysaccharide synthesis and export.

In proteobacteria, BY-kinases are transmembrane proteins with a N-terminal Wzz-like periplasmic domain and two transmembrane helices [12]. Low-resolution electron microscopy analysis of the BY-kinase Wzc from *E. coli* [13] showed that it forms a bell-shaped structure similar to the polysaccharide co-polymerase Wzz [14] (PDB ID 3B8O). The high-resolution crystal structure of the cytoplasmic kinase domain of the non-phosphorylated form of

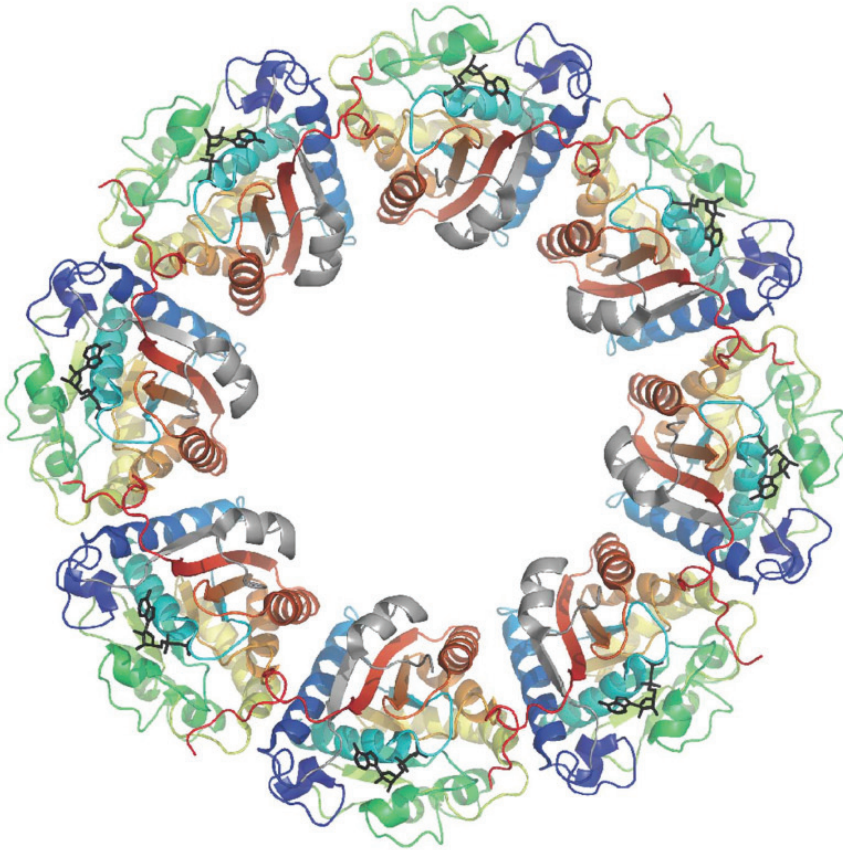


Figure 1. The CapA1B2 octameric ring. The octameric structure of the non-phosphorylated CapA1B2(K55M) mutant protein in complex with ADP-Mg [16] (PDB ID 2VED) is represented as cartoon. In each subunit, the α A- β A elements from CapA1 are colored in grey and the CapB2 moiety is colored by spectrum from blue to red. The bound nucleotides are highlighted as black sticks. doi:10.1371/journal.pone.0075958.g001

Wzc [15] (PDB ID 3LA6) demonstrated that it forms an octameric ring. In this organization, the Y-cluster of each subunit is bound to the active site of the neighboring subunit for trans-autophosphorylation. On the other hand, the crystal structure of the cytoplasmic kinase domain of the phosphorylated form of the Wzc orthologue Etk from *E. coli* [16] (PDB ID 3CIO) showed that it forms a monomer with a flexible and unstructured Y-cluster. Altogether, it is proposed that cyclic autophosphorylation and dephosphorylation of BY-kinases regulates association/dissociation of the octamer and thus the functioning of the capsule assembly machinery [4].

In firmicutes, the situation is quite similar except that BY-kinases are split into two proteins: one corresponds to the cytoplasmic catalytic domain of proteobacterial BY-kinases (about 230 residues) and the other is a transmembrane domain homologous to the Wzz-like domain (about 230 residues) of proteobacterial BY-kinases. Interestingly, interaction between these two proteins is required for full tyrosine-kinase activity, thus mimicking the proteobacterial organization. For this reason, the membrane protein is also called transmembrane modulator [8]. The C-terminal juxtamembrane domain (last 30 to 50 residues) of the transmembrane modulator has been shown to be essential for triggering the tyrosine-kinase activity of the cognate cytoplasmic protein [17]. More precisely, the structural characterization of the BY-kinase CapB2 from *S. aureus* fused to the juxtamembrane domain of the transmembrane modulator CapA1 [18] (PDB IDs 2VED & 3BFV) showed that the CapA1B2 chimera forms an

octameric ring similar to the cytoplasmic domain of Wzc (Figure 1) and that the C-terminal extremity of CapA1 is similar to the juxtamembrane region of Wzc, forming a α A- β A motif (Figure 2). This structure-function analysis demonstrated that the penultimate phenylalanine residue of CapA1 is directly involved in nucleotide binding, thus explaining the activation mechanism. It also suggested that, in firmicutes, trans-autophosphorylation of the C-terminal Y-cluster could induce the dissociation of the octamer, eventually resulting in the release of monomeric cytoplasmic kinase domains from the octameric transmembrane modulator.

In *Staphylococcus aureus*, two BY-kinases (CapB1 and CapB2) together with their cognate transmembrane modulators (CapA1 and CapA2) have been identified [17]. CapA1 and CapB1 are part of the *cap* operon coding for proteins involved in the biosynthesis of capsular polysaccharides while CapA2 and CapB2 are located elsewhere in the genome. Although both BY-kinases share more than 70% sequence similarity (Figure 2), only CapB2 displays an autophosphorylation activity *in vitro*. Even more surprisingly, despite the high sequence similarity (72% identity over the 30 residues of the juxtamembrane fragments) and the conservation of either a terminal (CapA2) or penultimate (CapA1) phenylalanine residue involved in nucleotide binding (Figure 2), CapA1 has been shown to activate CapB2 more efficiently than its cognate modulator CapA2 [17].

To understand such divergent observations between the two homologous proteins, we solved the crystal structures of both CapA1B1 and CapA2B2 chimera and compared them with the

structure of CapA1B2 [18]. Although the three structures are very similar, we pointed out small structural differences, which might explain the kinase-dead activity of CapB1. The relevance of these hypotheses was tested by *in vitro* biochemical experiments using site directed mutant proteins. However, none of our observations could explain the null kinase activity of CapB1. We tried to find out if CapB1 could hydrolyze ATP or transfer the γ -phosphate of the bound ATP to another protein substrate. However no evidence of such activity could be found in our assays. We thus discuss if the defective kinase activity of CapB1 observed *in vitro* corresponds to an authentic difference between CapB1 and CapB2 serving as yet uncharacterized purpose in *S. aureus* or reveals that other cellular partners are required for full tyrosine-kinase activity of CapB1 *in vivo*.

Results and Discussion

Why is CapA2 a Less Efficient Activator than CapA1?

Preliminary characterization of CapB2 [17] demonstrated that its tyrosine-kinase function is less efficiently activated by its cognate transmembrane modulator CapA2 than by CapA1, which gene is located somewhere else on the genome. In order to find out the structural basis of this discrepancy, we solved the crystal structure of the chimera CapA2B2 (last 27 C-terminal amino acids of CapA2 fused to the N-terminus of CapB2) [17].

Non-denaturing gel electrophoresis demonstrated that the purified CapA2B2 sample displayed the five bands (Figure 3) characteristic of the heterogeneously phosphorylated C-terminal Y-cluster of CapB2. Previous mass spectrometry analysis demonstrated indeed [18] that each band corresponds to a different phosphorylation level, from 0 to 4 phosphorylated residues among the 4 tyrosines 221, 222, 224 and 225 of the Y-cluster (Figure 2). This result demonstrated that the Y-cluster of the CapA2B2 chimera from *S. aureus* autophosphorylated spontaneously during its production process in *E. coli* cells. Autophosphorylation was however less efficient than for CapA1B2 since addition of ATP was required to observe the fully phosphorylated form of CapA2B2 (Figure 3).

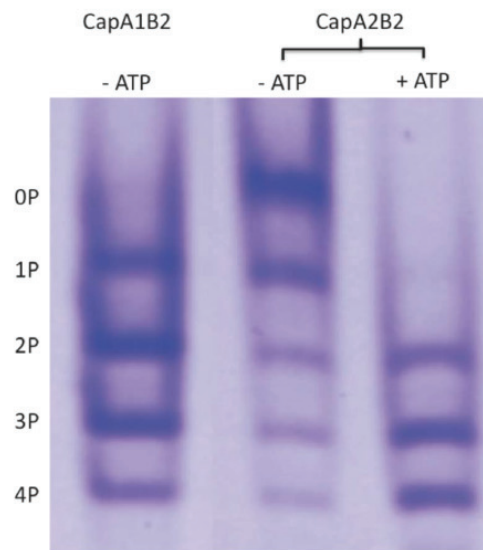


Figure 3. CapA2B2 phosphorylation state analysis. Electrophoretic profile of CapA1B2 and CapA2B2 directly after purification (– ATP) or after 4h incubation at 37°C with 200 μ M ATP-Mg (+ATP). The proteins were loaded on a 12.5% non-denaturing polyacrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue. The five observed bands were labeled according to the mass spectrometry analysis previously performed on CapA1B2 [16]: the upper band corresponds to the non-phosphorylated form of the protein (0P), and the lower band to the fully phosphorylated form (4P). doi:10.1371/journal.pone.0075958.g003

The crystal structure of the heterogeneously phosphorylated sample of CapA2B2 crystallized in the absence of nucleotide displays an rmsd of 0.8 Å over 225 C α atoms aligned with the CapA1B2/ADP-Mg model (PDB code 3BFV) used for phasing. As previously observed in the CapA1B2/ADP-Mg complex [18], the phosphorylated C-terminal Y-cluster of CapB2 is disordered and analysis of the crystal contacts using PISA [19] confirmed that the protein is a monomer. The CapA2 N-terminal part of the protein

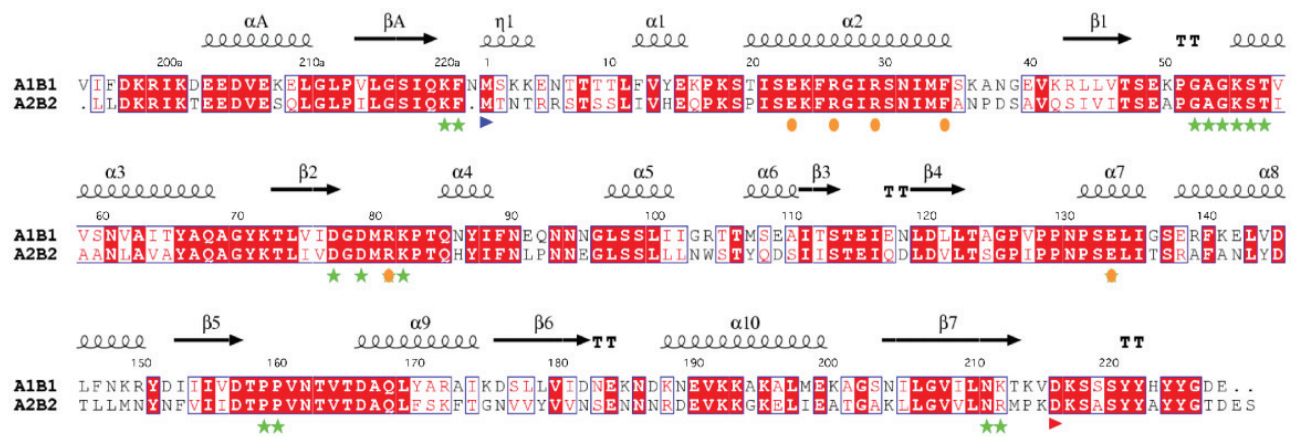


Figure 2. CapA1B1/CapA2B2 sequence comparison. The sequences of the chimera CapA1B1 and CapA2B2 have been aligned using ClustalW [32]. The conserved secondary structure elements as well as the 3_{10} -helix η 1 only observed in the CapA1B2 structure (PDB IDs 2VED and 3BFV) are indicated at the top of the alignment, using Esprit [33]. Residue numbering of CapA1B1 is indicated with CapA1 residues numbered from V194a to N222a and CapB1 residues numbered from M1 to E228. The N-terminal methionine of CapB1 and CapB2 is highlighted by a blue arrow. The active site residues involved in nucleotide binding (including the Walker A motif and the catalytic lysine K55) are highlighted by green stars. The conserved interface residues including the conserved EX₂RX₂R motif in helix α 2 are highlighted by orange dots. The first residue of the Y-cluster is indicated by a red arrow. doi:10.1371/journal.pone.0075958.g002

adopts the same α A- β A conformation than that of the CapA1 fragment. Interestingly, CapB2 residues 1 to 8 linking β A to helix α 1 are disordered (Figure 4A). This could be due to the absence of bound nucleotide. Unlike the CapA1B2(K55M) structure that contained bound ADP-Mg while no nucleotide was added to the crystallization solution [18], the active site of CapA2B2 did not reveal any electron density corresponding to a nucleotide that would have co-purified from *E. coli*. This is in agreement with a previous study showing that CapA2B2 displays a weaker affinity for nucleotides compared to CapA1B2, with respective K_d values for Mant-ATP of 190 nM and 50 nM [17]. The discrepancy between the CapA1 and CapA2 activation efficiencies has also been observed when using wild type CapB2 and a GST fusion of the juxtamembrane domain of the modulators. Indeed, it was shown that GST-CapA1 is a better activator than GST-CapA2 [17], demonstrating that the reduced efficiency of CapA2 is not an artifact due to the chimeric bond but seems rather to be linked to its reduced capacity to increase the affinity of CapB2 for nucleotide.

Investigating the Role of the CapA1 Residue Asn222

The penultimate residue Phe221 of CapA1 has been shown to be directly involved in ATP binding *via* a strong hydrophobic interaction with the base part of the nucleotide [18]. This essential residue corresponds to the last C-terminal residue Phe220 of CapA2 (Figure 2). In the apo structure of CapA2B2, Phe220 is slightly shifted compared to the CapA1 Phe221 residue stacked against the bound adenine in the CapA1B2/ADP-Mg complex (Figure 4A).

The reduced activation efficiency of CapA2 could be explained by the absence of the CapA1 last residue Asn222 (Figure 2) that interacts with the N-terminus of CapB2. As observed in the CapA1B2/ADP-Mg structure, Asn222 is in stacking interaction with Asn3 and H-bonds with main chain atoms from residues 1 and 2, stabilizing a short 3_{10} helix (η 1 in Figure 2) that forms a basic platform for the binding of the phosphorylatable Y-cluster, in particular through the Arg5/Tyr224 interaction (Figure 4B). CapB2 N-terminus also forms a hydrophobic pocket allowing proper positioning of the essential phenylalanine residue Phe221,

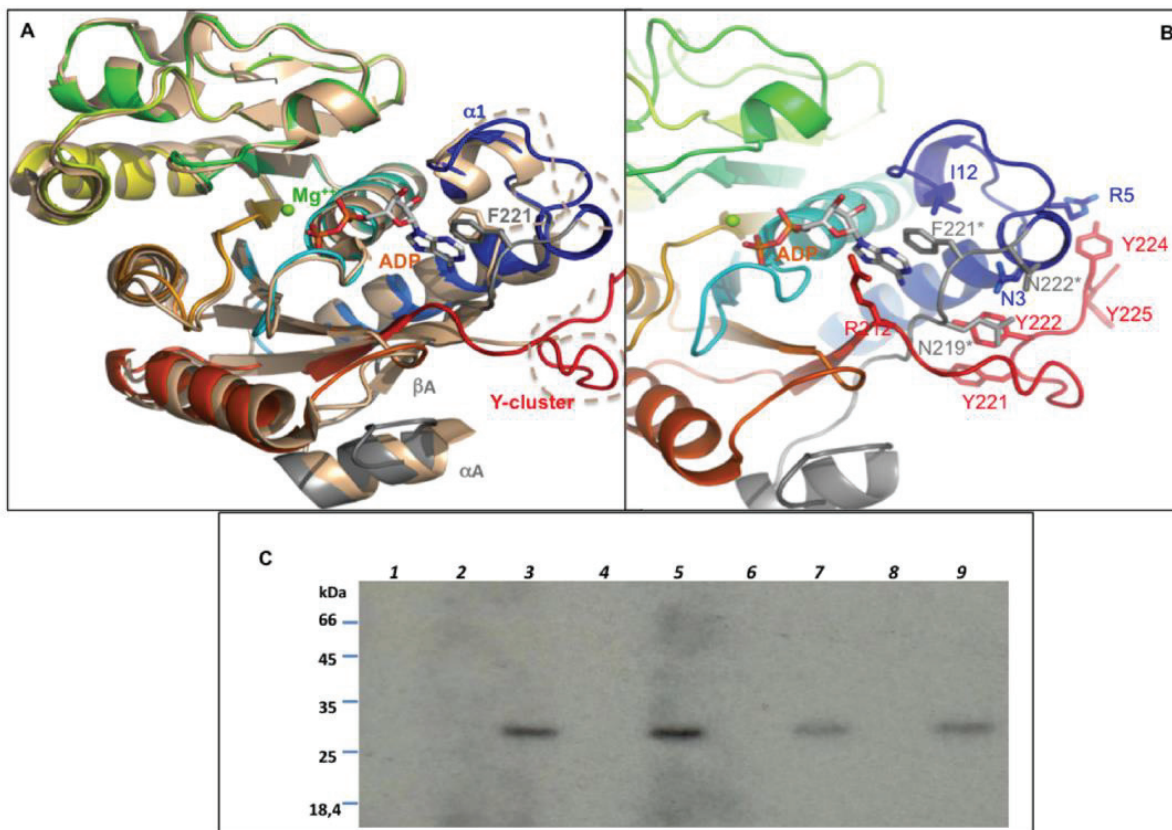


Figure 4. Comparison CapA1B2/CapA2B2. **A** – Superimposition of the CapA2B2 structure on a monomer from the CapA1B2(K55M)/ADP-Mg octamer (PDB ID 2VED). The proteins are shown as cartoon. CapA1B2(K55M) is colored by spectrum from blue to red. The CapA1 region is highlighted in grey and labeled (α A, β A). The CapA2B2 structure is colored in wheat. The disordered Y-cluster and loop β A- α 1 are highlighted as dashed lines. Residues F221* from CapA1 and F220 from CapA2 are shown in sticks as well as the ADP molecule bound in the CapA1B2(K55M) structure. **B** – Interaction networks of the CapA1 C-terminus and of the CapB2 N-terminus. Close view of the CapA1B2(K55M) structure shown in cartoon colored by spectrum. The bound ADP is shown in sticks with the Mg²⁺ ion as a green sphere. Residues discussed in the text are highlighted in sticks. CapA1 residues are labeled with a star. **C** – Effect of CapA1 residue Asn222 on CapB2 activity. CapB2 was incubated in the presence of radioactive ATP and different (wild type or mutated) CapA1 or CapA2 cytoplasmic C-terminal end peptides (CapA1Ct and CapA2Ct). CapB2 autophosphorylation was then analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. (lane 1) CapB2; (lane 2) CapA1Ct; (lane 3) CapB2 and CapA1Ct; (lane 4) CapA1Ct deleted from Asn222 (CapA1Ct Δ N222); (lane 5) CapB2 and CapA1Ct Δ N222; (lane 6) CapA2Ct; (lane 7) CapB2 and CapA2Ct; (lane 8) CapA2Ct with a C-terminal additional Asn221 (CapA2Ct+N221); (lane 9) CapB2 and CapA2Ct+N221. doi:10.1371/journal.pone.0075958.g004

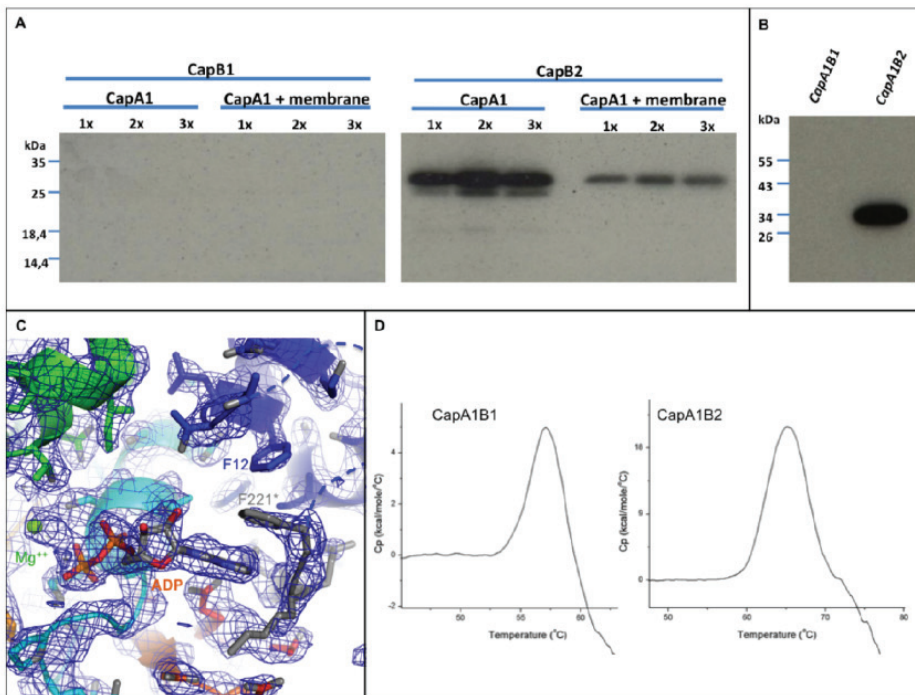


Figure 5. Functional and structural characterization of CapA1B1. **A** - CapB1 (left panel) and CapB2 (right panel) activation assays using either purified full length 6xHis-CapA1-FL (6xHis-CapA1-FL) or membrane fractions enriched with full-length 6xHis-CapA1-FL. An increasing concentration of CapA1 was used as indicated. CapB1 and CapB2 autophosphorylation was determined after incubation with radioactive ATP, SDS-PAGE separation and autoradiography. **B** - Phosphorylation of CapA1B1 and CapA1B2 during overexpression in *E. coli*. CapA1B1 and CapA1B2 purified from *E. coli* were analyzed by SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane. Their phosphorylation was revealed by immunoblotting using the anti-phosphotyrosine antibody 4G-10 and the secondary antibody HRP conjugate after direct film exposure. **C** - Electron density of the ADP-Mg molecule bound in the CapA1B1 active site. (2Fo-Fc) map contoured at 1 σ . The bound nucleotide and the residues involved in nucleotide and Mg²⁺ binding are shown in sticks. **D** - Stability of CapA1B1. Differential Scanning Calorimetry of CapA1B1 compared with CapA1B2.
doi:10.1371/journal.pone.0075958.g005

in particular through the Phe221-Ile12 stacking interaction (Figure 4B).

In order to verify the importance of the CapA1 residue Asn222, we produced a GST fused CapA1 cytoplasmic C-terminal fragment deleted from residue Asn222 (GST-CapA1Ct(Δ N222)) and compared its activation efficiency with that of the original GST-CapA1Ct fusion protein [17] (Figure 4C, lanes 3 and 5). Unfortunately, the Asn222 deletion did not affect the CapA1 ability to trigger CapB2 autophosphorylation. Furthermore, we showed that adding a C-terminal asparagine to GST-CapA2Ct also failed to increase CapB2 kinase activity (Figure 4C, lanes 7 and 9).

Only 7 out of the 30 residues of the C-terminal juxtamembrane fragments of CapA1 and CapA2 are not conserved (Figure 2). These substitutions concern residues located at the surface of the protein that do not interact with CapB2. Therefore, they cannot explain the CapB2 activation discrepancy observed *in vitro*. However, it is not clear if this discrepancy also exists *in vivo* where another protein could be required for CapA2-dependent CapB2 activation.

The N-terminal ends of CapA1 and CapA2 are also cytoplasmic and their function in BY-kinase activation has never been investigated. Thus, a stricter reliance on CapA2 N-terminal end for CapB2 activation than on CapA1 could be envisaged. However, it cannot be excluded that the lower activation efficiency of CapA2 could also correspond to distinct physiological purposes.

Why would CapB1 be Inactive?

In vitro assays did not show any autophosphorylation of CapB1, neither alone or in the presence of CapA1 or CapA2 [17]. We checked if this result was not an experimental artifact due to the use of a cytoplasmic chimera by testing the activity of wild-type CapB1 either in the presence of purified full-length 6xHis-CapA1 (6xHis-CapA1-FL) or in the presence of membrane fractions enriched with full-length 6xHis-CapA1-FL. However, the use of these more biological conditions did not allow us to restore the CapB1 autophosphorylation activity (Figure 5A). We thus analyzed the phosphorylation state of our purified CapA1B1 sample using immunodetection with anti-phosphotyrosine antibodies (Figure 5B). As expected no phosphorylation signal was detected for CapA1B1 in conditions where CapA1B2 is efficiently labeled. Thus, in contrary to CapA1B2, CapA1B1 did not spontaneously autophosphorylate during the production in *E. coli* cells.

According to the regulatory mechanism proposed for the BY-kinases [4], the inactive CapA1B1 protein was thus supposed to form the octameric ring observed for the inactive mutants CapA1B2(K55M) [18] and Wzc_{cyto}(K540M) [15]. To test this and further understand why CapB1 is less active than CapB2, we solved the crystal structure of the CapA1B1 chimera. The crystal structure of the CapA1B1/ADP-Mg complex displays an rmsd of 0.9 Å over 229 C α atoms aligned with the CapA1B2/ADP-Mg model (PDB code 3BFV) [18] used for phasing.

Clear electron density corresponding to a bound ADP molecule and associated Mg²⁺ ion was observed in the active site of

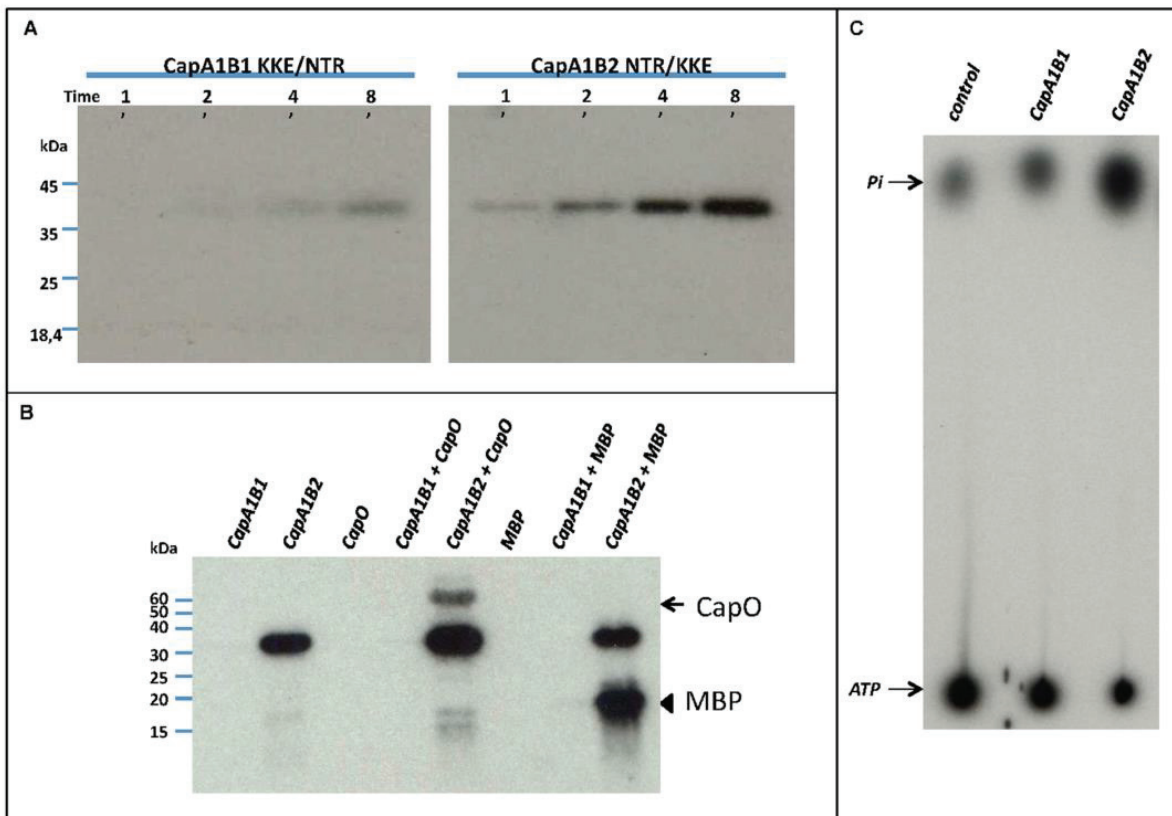


Figure 6. CapA1B1 activity assays. **A** – Effect of CapB2 N3T4R5 substitution for CapB1 K3K4E5 and vice versa on CapB1 and CapB2 kinase activity. CapA1B1(KKE/NTR) (left panel) and CapA1B2(NTR/KKE) (right panel) were incubated in the presence of radioactive ATP for either 1, 2, 4 or 8 minutes. After SDS-PAGE analysis, their autophosphorylation was visualized by autoradiography. **B** – CapO and myelin-binding protein (MBP) phosphorylation assays. The ability of CapA1B1 and CapA1B2 to phosphorylate CapO or the myelin-binding protein (MBP) was determined after incubation in the presence of radioactive ATP, SDS-PAGE analysis and film exposure. The arrow points to CapO whereas the arrowhead shows the MBP. **C** – ATPase activity of CapA1B1 and CapA1B2. The hydrolysis of [γ - 32 P] ATP was measured in the presence of either CapA1B1 or CapA1B2 as described under “Materials and Methods”. Migration of a control reaction mixture devoid of CapA1B1 or CapA1B2 is also shown. doi:10.1371/journal.pone.0075958.g006

CapA1B1 (Figure 5C). Despite the presence of the bound nucleotide, CapB1 residues 1 to 8 as well as the CapA1 last residue Asn222 are disordered. This suggests that the similar disorder observed in the CapA2B2 structure is not due to the absence of nucleotide. The stacking interaction between the CapA1 Phe221 and the base part of the bound ADP is conserved. Phe221 is stabilized in this position by a T-shaped hydrophobic interaction with CapB1 residue Phe12 (Figure 5C) replacing the stacking interaction with CapB2 residue Ile12 observed in the CapA1B2 structure (Figure 4B). Surprisingly, despite the inactivity of the protein, the CapA1B1 structure does not display the expected octameric conformation and the Y-cluster is disordered. This suggests that CapB1 is intrinsically in the monomeric active conformation compatible with the binding of specific protein substrate [18]. This hypothesis is supported by the conservation of the active site residues (Figure 2). Thus, although not autophosphorylating, CapB1 could be able to phosphorylate other endogenous substrates.

The basic isoelectric point of CapB1, with a calculated value of 8.8 (compared with 5.45 for CapB2), suggests that the formation of a CapB1 oligomer compatible with trans-autophosphorylation could be impaired by unfavorable electrostatic surface charges. Unfortunately, this hypothesis could not be verified since the octameric form of the BY-kinases is very difficult to observe in

solution, even with the inactive mutants CapA1B2(K55M) [18] and Wzc_{cyto}(K540M) [15]. Electron microscopy analysis of the CapA1/CapB1 and CapA2/CapB2 transmembrane complexes would thus be helpful to elucidate their biological organization.

Differential scanning calorimetry measurements performed at pH 7.8 revealed that, in these conditions, CapA1B1 is less stable than CapA1B2, with respective T_m values of 56.8°C and 66.2°C (Figure 5D). We thus evaluated if the basic nature of CapB1 could influence the optimal pH of the *in vitro* assays. However, the use of buffers with pH ranging from 5 to 8 had no effect on CapA1B1 autophosphorylation and the protein remained inactive (data not shown).

Investigating the Role of the CapB N-terminus

We tried to confirm that the lack of autophosphorylation activity of CapB1 could be related to its incapacity to oligomerize. Half of the octamer interface involves the conserved EX₂RX₂R motif of helix α 2 [3,17] (Figure 2) forming salt bridges with surface loops from the neighbouring subunit. This conserved contact area has been shown to be essential for both trans-autophosphorylation and polysaccharide synthesis [15]. The other 50% of the interface area is provided by the Y-cluster [18]. This suggests that its proper positioning is essential for the stability of the octamer. The residues involved in the binding of the Y-cluster in CapB2 are conserved in

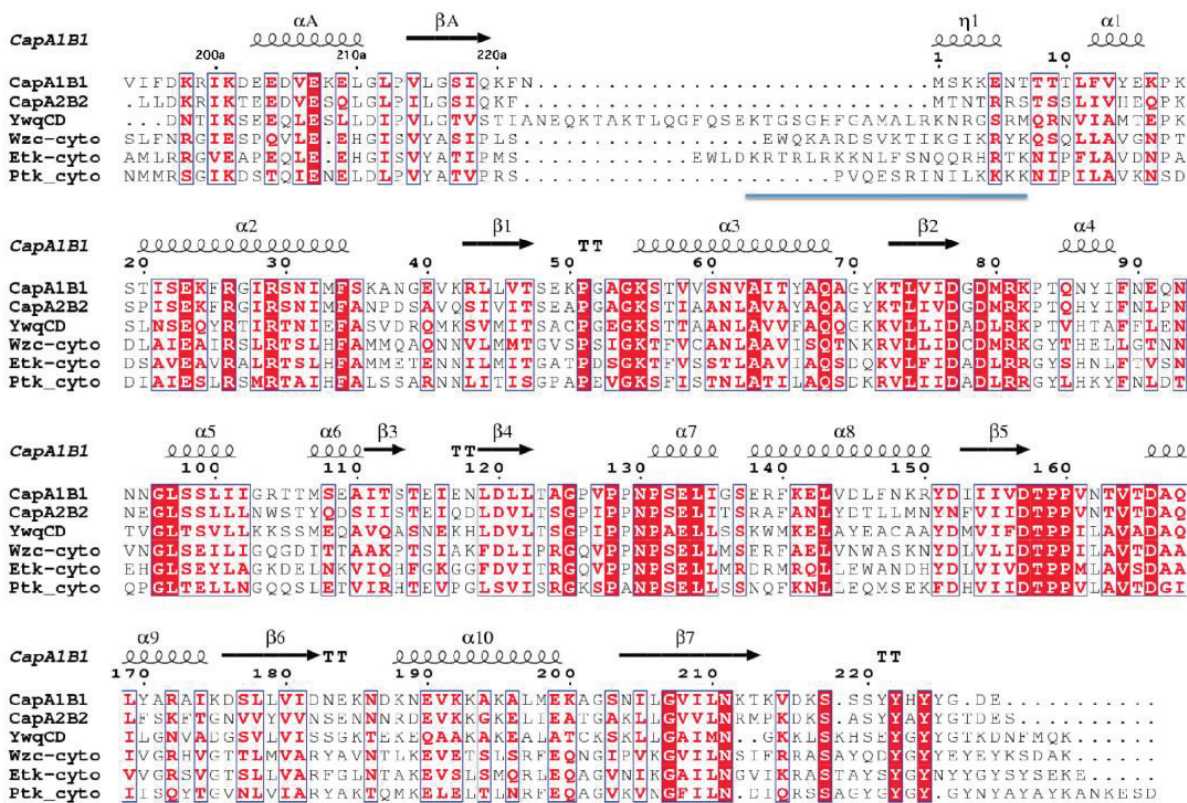


Figure 7. Sequence comparison of BY-kinases from firmicutes and proteobacteria. The sequences from CapA1B1 and CapA2B2 from *S. aureus* have been aligned with the chimera YwqCD constructed with the proteins YwqC and YwqD from *B. subtilis* (Swiss-Prot entries P96715 and P96716, respectively) as well as with the cytoplasmic domain of the proteobacterial BY-kinases Wzc and Etk from *E. coli* and Ptk from *Acinetobacter johnsonii* (Swiss-Prot entry O52788). The CapA1B1 residue numbering and secondary structure elements are shown at the top of the alignment as in Figure 2. The RK-cluster region is underlined. doi:10.1371/journal.pone.0075958.g007

CapB1 except for few N-terminal residues, including the previously mentioned Arg5 that is replaced by a glutamate and Asn3 that is replaced by a lysine (Figure 2). As mentioned above, Arg5 and Asn3 are respectively stacked against Tyr225 of the Y-cluster and Asn222 from CapA1. Asn3 also makes H-bonds with the CapA1 residue Gln219, which is stacked against Tyr222 of the Y-cluster (Figure 4B). The altered N-terminal sequence of CapB1 could thus result in a decreased affinity for the phosphorylatable Y-cluster and a destabilization of the octamer. In order to assess the role of the non-conserved N-terminal residues on the trans-autophosphorylation activity, we exchanged residues N3T4R5 of CapB2 and K3K4E5 residues of CapB1 and tested the activity of the resulting mutant chimera CapA1B1(KKE/NTR) and CapA1B2(NTR/KKE). However, these mutations did not restore the activity of CapB1 nor inhibit CapB2 (Figure 6A), indicating that these N-terminal residues do not play the essential role suggested by the structure analysis.

Could CapA1B1 Phosphorylate an Endogenous Substrate?

Autophosphorylation allows BY-kinases to shift from an inactive octameric state to a monomeric active conformation compatible with the binding of their specific protein substrates [18]. This mechanism is supported by *in vitro* experiments showing that CapB2 devoid of its Y-cluster is also able to phosphorylate CapO [18]. The apparent incapacity of CapB1 to form an octamer suggests that it could be intrinsically in the active conformation,

ready to phosphorylate endogenous substrates. We thus tested the capacity of CapA1B1 to phosphorylate CapO, the UDP-N-acetylmannosamine dehydrogenase of *S. aureus* that has been shown to be phosphorylated by CapB2 on residue Tyr89 [11]. Unfortunately, CapA1B1 was unable to phosphorylate CapO (Figure 6B). Nevertheless, it could not be excluded that the different electrostatic surface displayed by CapA1B1 and CapA1B2 could be responsible for distinct substrate specificity. We then also tested CapB1 ability to phosphorylate the myelin-binding protein (MBP), a protein classically used to detect kinase activity in biological samples. However, once again, while CapA1B2 efficiently phosphorylated the MBP, CapA1B1 did not (Figure 6B).

Finally, we checked whether or not CapA1B1 could hydrolyze ATP. We thus analyzed the ATPase activity of CapA1B1 using radioactive [γ -³²P]ATP (Figure 6C). However, in conditions where CapA1B2 produced inorganic radioactive phosphate at the expense of ATP, we did not observe any ATP hydrolysis in the presence of CapA1B1. Altogether, this data prove that CapB1 does not possess a tyrosine-kinase activity despite its BY-kinase signature [3] and a 3D structure very similar to that of the active BY-kinase CapB2. Unfortunately, our structural and biochemical analysis failed to provide any explanation for CapB1 inactivity.

Conclusion and Perspectives

Although our *in vitro* assays failed to detect any activity for CapB1, this inactivity cannot be explained by our structural

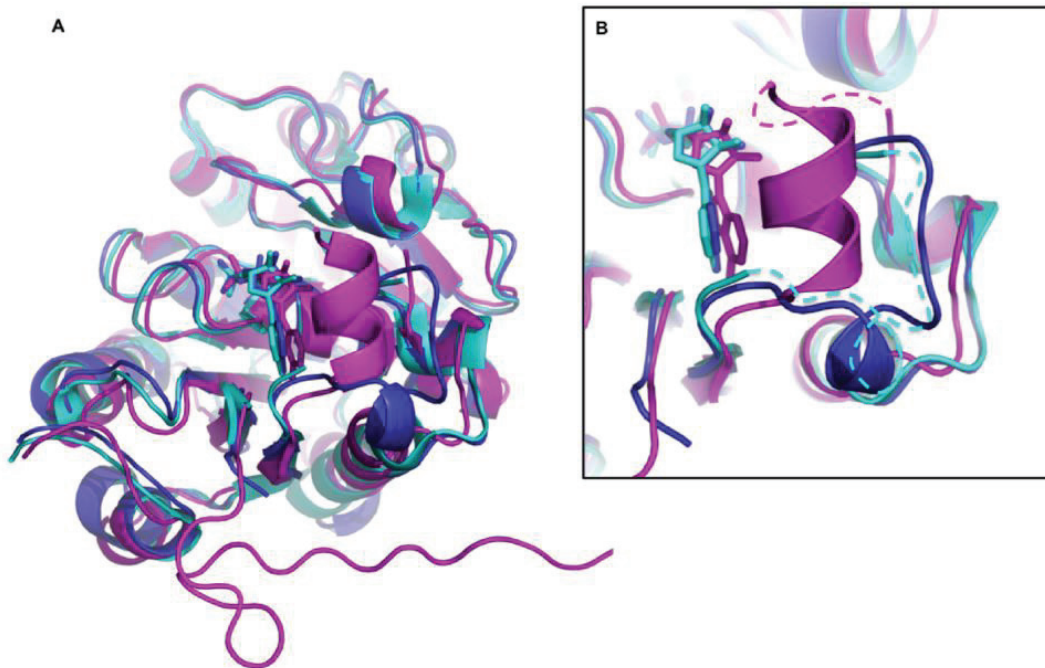


Figure 8. Structural comparison CapAB/Wzc. **A** – Global superimposition. The structure of CapA1B1 (in cyan) has been superimposed with the CapA1B2 phosphorylated monomer (in blue) (PDB ID 3BFV) as well as with a subunit of the non-phosphorylated Wzc(K540M) octamer (in magenta) (PDB ID 3LA6). The structures are shown in cartoon with bound ADP molecules in sticks. **B** – Close view of the RK-cluster region. The flexible parts of the CapA1B1 and Wzc structures are highlighted as dashed lines.
doi:10.1371/journal.pone.0075958.g008

analysis. We propose that the poorly conserved N-terminus of CapB1 and CapB2 could be responsible for their different behaviors. An interesting hypothesis concerning the role of this flexible extremity could come from the comparison with the structures of the BY-kinases Wzc [15] and Etk [16] from *Escherichia coli*. The latter display in this region a flexible loop containing a basic insert called RK cluster (Figure 7) that has been shown to be essential for the exopolysaccharide co-polymerase activity of the protein. It has also been proposed to influence Wzc and Etk tyrosine-kinase activity through protein-protein interactions with other components of the capsule synthesis machinery [15]. Interestingly, an even longer basic insert is also observed in the chimera YwqCD from the firmicute *Bacillus subtilis* (Figure 7). Superimposition of the CapAB and Wzc structures (Figure 8) suggests that the CapAB N-terminus could play a similar role to the Wzc RK-cluster in the multiprotein transmembrane complex. These interactions could be essential for CapB1 activity and play a minor role for CapB2.

On the other hand, we cannot completely rule out that CapB1 would be indeed inactive *in vivo*. On this basis, one would also wonder what would be the benefit for *Staphylococcus* to produce an inactive BY-kinase. A possible answer is that CapB1 and CapB2 could fulfill distinct cellular functions. Supporting this idea, evidences have been provided that the splitting into two distinct proteins allows BY-kinases from firmicutes to participate in the regulation of distinct cellular processes [7]. The analysis of strains deficient for *capB1*, *capB2*, *capA1* and/or *capA2* should help clarify the respective cellular function of the two systems. Another hypothesis lies in the duplication of BY-kinase genes in several genomes of bacteria [3]. For example, in *B. subtilis*, a similar situation is observed with an active PtkA and an inactive PtkB [8]. One could assume that an inactive BY-kinase could be a

regulatory mean to interfere with the cellular function of the active one.

A parallel can be drawn with eukaryotic proteins termed pseudokinases that contain a kinase-like domain but catalytically inactive [20]. Much remains to be learnt about the intricate functions of pseudokinases. However, it is proposed that they could act as molecular scaffolds or allosteric factors to promote the activity of other protein-kinases. To illustrate this, the ILK (Integrin-linked kinase) pseudokinase functions as a scaffolding protein mediating interactions with several proteins via multiple sites including its pseudoactive site and is crucial in cell-extracellular matrix adhesions [21]. On the other hand, the HER3 (also called EGFR or ErbB1) pseudokinase domain allosterically activates the functional tyrosine kinase domain of HER2 (ErbB2) and contributes to the development, proliferation and survival of tumor cells [22,23]. Like for CapB1, attempts to convert human HER3 to an active kinase by reinstating catalytic important residues have failed to restore activity [24]. A very interesting and hypothesis would bet thus that the inactive CapB1 behaves like a pseudokinase and plays an important role for CapB2 to participate in the regulation of some cellular processes including polysaccharide production. This assumption is supported by a recent study reporting that in bacteria some cellular processes could also require interplay between an active protein-kinase and an inactive pseudokinase. Indeed, the protein-kinase PknB of *Mycobacterium tuberculosis* operates as key regulator of peptidoglycan biosynthesis through its interaction with the pseudokinase domain of MviN [25].

Answering all these questions is challenging and will required comprehensive cellular analysis. Complicated as it may be, those future studies should lead to our better understanding of BY-

Table 1. Bacterial strains, plasmids and primers used in this study.

Strain	Description	Reference
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻, [proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987
BL21 pRep4-GroESL	<i>F', dmc, ompT, hsdS (r⁻ gm⁻ b) galλ, pRep4-groESL</i>	Amrein <i>et al.</i> , 1995
Plasmid	Description	Reference
pQE30	Expression vector generating His ₆ fusion protein, Amp ^R	Qiagen
pGEXVM	Expression vector generating GST fusion protein, Amp ^R	Molle <i>et al.</i> , 2003
pQE30-Cap5A1B1	Encoding last 29 amino acids of Cap5A1 (from Val194 to Asn222) fused to Cap5B1 (from Met1 to Glu228), His ₆ A1CtB1, cloned in BamHI/PstI sites, Amp ^R	Soulat <i>et al.</i> , 2006
pQE30-Cap5A1B2	Encoding last 29 amino acids of Cap5A1 (from Val194 to Asn222) fused to Cap5B2 (Met1 to Ser230), His ₆ A1CtB2, cloned in BamHI/HindIII sites, Amp ^R	Soulat <i>et al.</i> , 2006
pQE30-Cap5O	Encoding Cap5O, His ₆ CapO (from Met2 to Lys437), cloned in BamHI/PstI sites, Amp ^R	Soulat <i>et al.</i> , 2007
pQE30-Cap5A1B1 KKE/NTR	Same as pQE30-Cap5A1B1 but mutated on K3N,K4T and E5R	This study
pQE30-Cap5A1B2 NTR/KKE	Same as pQE30-Cap5A1B2 but mutated on N3K,T4K and R5E	This study
pGEXVM-A1Ct	Encoding last 29 amino acids of Cap5A1 from Val194 to Asn222, GSTA1Ct, cloned in BamHI/HindIII sites, Amp ^R	Soulat <i>et al.</i> , 2006
pGEXVM-A1CtΔN222	Same as pGEXVM-A1Ct but deleted of Asn222	This study
pGEXVM-A2Ct	Encoding last 27 amino acids of Cap5A2 from Leu194 to Phe220, GSTA2Ct, cloned in BamHI/HindIII sites, Amp ^R	Soulat <i>et al.</i> , 2006
pGEXVM-A2Ct+N222	Same as pGEXVM-A2Ct but with a additional C-terminal Asn	This study
pET15b-A1-FL	Encoding Cap5A1 from Met1 to Asn222, His ₆ A1, cloned in NdeI/BamHI sites, Amp ^R	Soulat <i>et al.</i> , 2006
pET15b-B1	Encoding Cap5B1 from Met1 to Glu228, His ₆ B1, cloned in NdeI/BamHI sites, Amp ^R	Soulat <i>et al.</i> , 2006
pET15b-B2	Encoding Cap5B1 from Met1 to Ser230, His ₆ B2, cloned in XhoI/BamHI sites, Amp ^R	Soulat <i>et al.</i> , 2006
Primer	5' to 3' sequence ^{a,b,c}	Reference
B1 (-)	TGCACTGCAGTTATTCATCTCCATAATAGTGAT	This study
B2 (-)	CCCAAGCTTCATGATTCATCAGTCCCATAATA	This study
A1ct (+)	TATGGATCCAAGTAATTTTCGATAAGCG	This study
A2ct (+)	TATGGATCCTTATTAGATAAGCGTATTAAGACAG	This study
A1B2 N3K4K R5E (-)	CTTGATGACTTCTTCTTTCTTTTCGTCATATTAATTTTTG	This study
A1B1 K3NK4T E5R (-)	GTGTTGTTGTCGATTTTCGCGTATTTGACATATTAATTTTTG	This study
A1ctΔN222 (-)	TATAAGCTTTTAAAATTTTGAATTGAACCCAATAC	This study
A2ct+N222 (-)	TATAAGCTTTTAAATTAATTTTGTATTGAACCTAAATAGG	This study

^aForward and reverse primers are represented by plus (+) or minus (-), respectively.

^brestriction sites are italicized.

^cThe bases mutated from those present in the wild type are bold.

doi:10.1371/journal.pone.0075958.t001

kinases mediated regulatory functions of the bacterial cell physiology.

Materials and Methods

Cloning and Site Directed Mutagenesis

Escherichia coli XL1-Blue cells were used as a host strain for DNA manipulations. Protein overexpression was performed using *E. coli* BL21(DE3) strain. Luria-Bertani (LB) broth was used for growth and expression, supplemented when required with tetracycline and/or ampicillin to a final concentration of 15 µg/ml and 100 µg/ml, respectively. Details concerning bacterial strains and plasmids used in this study are summarized in Table 1. Site-directed mutagenesis was carried out by using polymerase chain reaction and primers described in Table 1. Briefly, plasmids pQE30-Cap5A1B2 and pQE30-Cap5A1B1 were used as templates in order to introduce the triple substitutions N3T4R5 for

K3K4E5 and K3K4E5 for N3T4R5 in CapA1B2 and CapA1B1, respectively. The mutated and amplified DNA fragments were digested with either *Bam*H1 and *Hind*III or *Bam*HI and *Pst*I, for CapA1B2 and CapA1B1, respectively, and ligated with pQE30 vector previously linearized with the same restriction enzymes. Asn222 deletion in CapA1Ct or insertion in CapA2Ct were achieved using respectively plasmids pGEXVM-A1Ct and pGEXVM-A2Ct as templates and primer pairs A1ctΔN222 (-)/A1ct (+) and A2ct+N222 (-)/A2ct (+), respectively. The amplified DNA fragments were digested using *Bam*H1 and *Hind*III and introduced into the pGEXVM vector previously linearized with the same restriction enzymes.

Protein Expression and Purification

The wild type as well as mutated 6xHis-tagged proteins were overexpressed and purified as described previously [10]. Briefly, the proteins were expressed in *E. coli* BL21(DE3) strain at 28°C.

Table 2. Structural data.

Data set	CapA1B1	CapA2B2
Data collection		
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁
a, b, c (Å)	41.03, 64.63, 88.28	36.33, 88.67, 39.41
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 115.35, 90.0
Resolution (Å) ^a	50.0–2.2 (2.33–2.20)	35.6–1.3 (1.37–1.30)
Roberved (%) ^b	9.3 (111.3)	8.2 (55.1)
Observed reflections	59 025 (9 419)	143 663 (20 588)
Unique reflections	12 422 (1 958)	54 294 (7 988)
Mean(I)/σ(I)	14.74 (1.93)	9.8 (2.1)
Completeness (%)	99.7 (99.5)	98.3 (99.6)
Refinement statistics		
Resolution range used (Å)	44.1–2.2 (2.42–2.20)	33.0–1.3 (1.32–1.30)
Number of used reflections	12 421	54 245
Test set size (%)	5.0	5.0
R _{work} (%) ^c	19.72 (26.87)	17.16 (25.05)
R _{free} (%)	24.20 (32.71)	19.07 (24.82)
Number of protein atoms/a. u.	1774	1769
Number of water molecules	27	207
Ligand	ADP-Mg	none
Isotropic B value (Å ²)		
- mean	57.56	15.43
- minimum	35.93	5.20
- maximum	91.71	58.68
Rms deviation from ideal values:		
- bond lengths (Å)	0.008	0.006
- bond angles (°)	1.212	1.012
- chirality angles (°)	0.073	0.069
- dihedral angles (°)	15.617	11.055
- planarity (°)	0.005	0.005
Ramachandran statistics (%)		
- favoured	97.7	99.6
- outliers	0.0	0.0

^aNumbers in parentheses represent values in the highest resolution shell.

^b $R_{\text{observed}} = \sum_i |I(h_i) - \langle I(h) \rangle| / \sum_i I(h_i)$ where $I(h_i)$ is the intensity value of the i -th measurement of h and $\langle I(h) \rangle$ is the corresponding mean value of $I(h)$ for all i measurements.

^c $R_{\text{work}} = \sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$, where $|F_{\text{obs}}|$ and $|F_{\text{calc}}|$ are the observed and calculated structure factor amplitudes respectively. R_{free} is the same as R_{work} but calculated with a subset of all reflections (test set) that was never used in crystallographic refinement.

doi:10.1371/journal.pone.0075958.t002

They were purified at 4°C by IMAC immediately followed by gel filtration on a Superdex S75 column. The purified samples were concentrated using Centricon centrifugal filter units (Millipore) of 10 kDa molecular weight cut-off and stored at –20°C in a buffer containing 25 mM Bis-Tris, pH 6.5, 150 mM NaCl, and 10% glycerol. GST-fused CapA1 and CapA2 proteins were purified as previously described [15].

Crystallization

Crystallization conditions for the CapA1B1 and CapA2B2 proteins were determined at 18°C using commercial crystallization screening kits and sitting drop method. Liquid handling was

performed by a nanodrop crystallization robot (Cartesian). The crystals were optimized manually with homemade solutions using the hanging drop method. CapA2B2 crystallized at 7 mg/ml in 25% PEG 550 MME, 100 mM Hepes, pH 7.5, 5 mM MgCl₂ in the absence of nucleotide. The best crystals of CapA1B1 were obtained at 4 mg/ml in the presence of 5 mM ADP-Mg in 28% PEG 1000 and 100 mM Tris-HCl, pH 8.5.

Structure Determination

Crystals were, soaked in a cryoprotectant solution consisting of the reservoir solution supplemented with increasing glycerol concentrations up to 25% (w/v) and subsequently flash-frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France) on beamlines ID23-2 and ID29 for CapA2B2 and CapA1B1, respectively. The CapA2B2 crystals diffracted up to 1.3 Å resolution in space group P2₁ with 1 molecule per asymmetric unit. The CapA1B1 crystals diffracted up to 2.4 Å resolution in space group P2₁2₁2₁, with 1 molecule per asymmetric unit.

Diffraction data were processed using the program Mosflm [26] and the CCP4i package [27]. Phasing was performed by molecular replacement with the program Phaser [28] using the CapA1B2 structure (PDB code 3BFV) [18] as starting model. Structure refinement was performed using the programs Buster [29] and Phenix [30]. Models were manually optimized using the model-building software COOT [31]. A summary of the refinement and data statistics is given in Table 2.

Kinase and ATP Hydrolysis Assays

In vitro phosphorylation of 0.1 μg of different purified proteins was carried out in a reaction mixture containing 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, and 10 μM ATP with 200 μCi/ml [γ -³²P]ATP. When appropriated, 1 μg of CapO or 0.5 μg of Myelin Basic Protein (MBP) were added as substrate. After 20 min incubation at 37°C the samples were analyzed using SDS-PAGE. After migration the gels were soaked in 16% TCA for 10 min at 90°C and stained with Coomassie Brilliant Blue. Radioactive proteins were visualized by autoradiography using direct exposure to films.

For ATPase assays, we used the same procedure as previously described [25]. Briefly, proteins were incubated in the presence of radioactive ATP at 5 μM concentration in the same buffer as used in the kinase assays. The reaction was stopped by cooling the reaction mixture at 4°C. One microliter of each sample was analyzed by thin layer chromatography using PEI-cellulose F plates from Merck. The plates were subsequently dried out and analyzed by autoradiography.

Immunoblot Analysis

CapA1B1 and CapA1B2 purified samples were loaded on SDS-PAGE and tyrosine autophosphorylation was determined by immunoblotting using the anti-phosphotyrosine polyclonal 4G-10 antibody (Millipore) at 1/2000 dilution. A mouse anti-rabbit secondary antibody HRP conjugate (Biorad) was used at 1/5000 dilution. Membranes were developed using the chemiluminescent substrate Supersignal® West Pico from Thermo.

Differential Scanning Calorimetry

DSC experiments were performed using a VP-DSC calorimeter (Microcal®). CapA1B1 and CapA1B2 samples were used at a concentration of 10 μM in Tris-HCl 25 mM, pH 7.8, with 250 mM and 100 mM NaCl, respectively. Two successive scans

from 20°C to 80°C at a heating speed of 60°C/h were performed for each experiment. Data were analyzed using the MicroCal Origin software provided by the manufacturer.

Acknowledgments

The crystallization and calorimetry works benefited from the Structural Biology and Proteomic Unit of IMAGIF facilities (<https://www.imagif.cnrs.fr/>). We acknowledge the use of ESRF beam lines ID29 and ID23-2. We thank Pr. A.J. Cozzone for his continuous interest.

References

- Saraste M, Sibbald PR, Wittinghofer A (1990) The P-loop—a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 15: 430–434.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1: 945–951.
- Jadeau F, Bechet E, Cozzone AJ, Deléage G, Grangeasse C, et al. (2008) Identification of the idiosyncratic bacterial protein tyrosine kinase (BY-kinase) family signature. *Bioinformatics* 24: 2427–2430.
- Grangeasse C, Nessler S, Mijakovic I (2012) Bacterial tyrosine kinases: evolution, biological function and structural insights. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367: 2640–2655.
- Whitfield C (2006) Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* 75: 39–68.
- Obadia B, Lacour S, Doublet P, Baubichon-Cortay H, Cozzone AJ, et al. (2007) Influence of tyrosine-kinase Wzc activity on colanic acid production in *Escherichia coli* K12 cells. *J Mol Biol* 367: 42–53.
- Mijakovic I, Petranovic D, Bottini N, Deutscher J, Ruhdal Jensen P (2005) Protein-tyrosine phosphorylation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 9: 189–197.
- Mijakovic I, Poncet S, Boel G, Maze A, Gillet S, et al. (2003) Transmembrane modulator-dependent bacterial tyrosine kinase activates UDP-glucose dehydrogenases. *EMBO J* 22: 4709–4718.
- Grangeasse C, Obadia B, Mijakovic I, Deutscher J, Cozzone AJ, et al. (2003) Autophosphorylation of the *Escherichia coli* protein kinase Wzc regulates tyrosine phosphorylation of Ugd, a UDP-glucose dehydrogenase. *J Biol Chem* 278: 39323–39329. Epub 32003 Jul 39327.
- Soulat D, Grangeasse C, Vaganay E, Cozzone AJ, Duclos B (2007) UDP-Acetyl-Mannosamine Dehydrogenase Is an Endogenous Protein Substrate of *Staphylococcus aureus* Protein-Tyrosine Kinase Activity. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13: 45–54.
- Gruszczak J, Fleurie A, Olivares-Illana V, Bechet E, Zanella-Cleon I, et al. (2011) Structure analysis of the *Staphylococcus aureus* UDP-N-acetyl-mannosamine dehydrogenase Cap5O involved in capsular polysaccharide biosynthesis. *J Biol Chem* 286: 17112–17121.
- Morona R, Purins L, Tocilj A, Matte A, Cygler M (2009) Sequence-structure relationships in polysaccharide co-polymerase (PCP) proteins. *Trends Biochem Sci* 34: 78–84.
- Collins RF, Beis K, Clarke BR, Ford RC, Hulley M, et al. (2006) Periplasmic protein-protein contacts in the inner membrane protein Wzc form a tetrameric complex required for the assembly of *Escherichia coli* group 1 capsules. *J Biol Chem* 281: 2144–2150.
- Tocilj A, Munger C, Proteau A, Morona R, Purins L, et al. (2008) Bacterial polysaccharide co-polymerases share a common framework for control of polymer length. *Nat Struct Mol Biol* 15: 130–138.
- Bechet E, Gruszczak J, Terreux R, Gueguen-Chaignon V, Vigouroux A, et al. (2010) Identification of structural and molecular determinants of the tyrosine-

Accession Numbers

Coordinates and data of the CapA1B1 and CapA2B2 structures have been deposited into the Protein Data Bank with ID codes 4JLV and 4JMP, respectively.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JG VO-I JN VG-C MA-N CG SN. Performed the experiments: JG VO-I JN AF EB CF MA-N. Analyzed the data: JG VO-I JN SM CG SN. Wrote the paper: CG SN.

- kinase Wzc and implications in capsular polysaccharide export. *Mol Microbiol* 77: 1315–1325.
- Lee DC, Zheng J, She YM, Jia Z (2008) Structure of *Escherichia coli* tyrosine kinase Etk reveals a novel activation mechanism. *EMBO J* 27: 1758–1766.
- Soulat D, Jault JM, Duclos B, Geourjon C, Cozzone AJ, et al. (2006) *Staphylococcus aureus* operates protein-tyrosine phosphorylation through a specific mechanism. *J Biol Chem* 281: 14048–14056.
- Olivares-Illana V, Meyer P, Bechet E, Gueguen-Chaignon V, Soulat D, et al. (2008) Structural basis for the regulation mechanism of the tyrosine kinase CapB from *Staphylococcus aureus*. *PLoS Biol* 6: e143.
- Krissinel E, Henrick K (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372: 774–797.
- Boudeau J, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Alessi DR (2006) Emerging roles of pseudokinases. *Trends Cell Biol* 16: 443–452.
- Qin J, Wu C (2012) ILK: a pseudokinase in the center stage of cell-matrix adhesion and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 24: 607–613.
- Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF, 3rd, et al. (2003) The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8933–8938.
- Jura N, Shan Y, Cao X, Shaw DE, Kuriyan J (2009) Structural analysis of the catalytically inactive kinase domain of the human EGF receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21608–21613.
- Prigent SA, Gullick WJ (1994) Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera. *EMBO J* 13: 2831–2841.
- Gee CL, Papavinasundaram KG, Blair SR, Baer CE, Falick AM, et al. (2012) A phosphorylated pseudokinase complex controls cell wall synthesis in mycobacteria. *Sci Signal* 5: ra7.
- Powell HR (1999) The Rossmann Fourier autoindexing algorithm in MOSFLM. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55 (Pt 10): 1690–1695.
- Collaborative Computational Project N (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50: 760–763.
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, et al. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Cryst* 40: 658–674.
- Bricogne G, Blanc E, Brandl M, Flensburg C, Keller P, et al. (2009) BUSTER. version 280 Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.
- Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Davis IW, et al. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 213–221.
- Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst D-Biol Cryst* 60: 2126–2132.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, et al. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31: 3497–3500.
- Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metz F (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15: 305–308.

**Etude de l'interaction entre la tyrosine-kinase
Wzc et sa phosphatase associée Wzb chez
*Escherichia coli***

Le modèle actuel de régulation de la production des polysaccharides extracellulaires propose que des cycles de phosphorylation et déphosphorylation des BY-kinases soient régulés par une phosphotyrosine-phosphatase associée. Malgré les nombreuses études montrant le rôle essentiel des paires BY-kinase/phosphatase dans le contrôle des processus régulés par la phosphorylation des BY-kinases, aucune information concernant les motifs nécessaires à l'interaction entre les protéines de ces deux familles n'avaient été mis en évidence. Notre étude couplant des résultats de résonance magnétique nucléaire (RMN) à des approches de biochimie et de cinétique enzymatique a permis de mettre en évidence, pour la première fois, des éléments structuraux intervenant dans l'interaction entre Wzc, une des BY-kinases d'*E. coli*, et sa LMW-PTP associée, Wzb.

Dans un premier temps, une analyse des interactions entre le domaine cytoplasmique de Wzc (Wzc_{CD}) et Wzb a été réalisée par résonance plasmonique de surface. Afin de visualiser l'importance du cluster de tyrosines dans cette interaction, une forme tronquée de ce cluster a été construite. Cette approche nous a permis d'identifier que l'interaction entre ces deux protéines était majoritairement due à une surface autre que le cluster de tyrosines. Basées sur cette observation, des études de RMN ont été réalisées à partir de mélanges de Wzc_{CD} tronquée de son cluster de tyrosines et de Wzb dans des proportions variées. Nous avons observé que les résidus pour lesquels les signaux de RMN sont significativement diminués se situent au niveau de l'hélice contenant le motif EX₂RX₂R important pour l'oligomérisation des BY-kinases. Le rôle de ce motif a alors été confirmé par des approches biochimiques révélant que des mutations au sein de ce dernier affectaient la capacité de Wzc_{CD} à interagir avec et à être déphosphorylée par Wzb. Cette première observation montre que Wzb pourrait, au-delà de son rôle de phosphatase, permettre le maintien de l'état faiblement phosphorylé de Wzc en empêchant la réassociation des monomères et donc la transphosphorylation de Wzc.

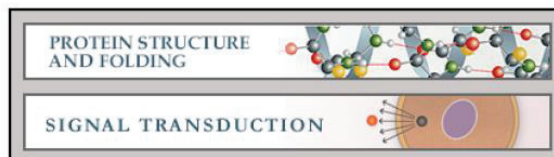
Dans un second temps, nous avons observé par RMN que la surface d'interaction mise en jeu au niveau de Wzb se trouve à proximité de son site catalytique et ce malgré l'absence de substrat potentiel (le cluster de tyrosines n'est pas présent dans cette étude). En effet, les résidus dont le signal semble être le plus perturbé se situent au niveau de la séquence C⁹X₅R¹⁵(T/S) permettant l'attaque nucléophile du résidu phosphorylé et la stabilisation de l'état de transition. Cependant, ces modifications ne sont pas visibles en présence de phosphate. Ces observations semblent traduire un effet allostérique de l'interaction Wzc_{CD}/Wzb au niveau du site catalytique

de Wzb. Nous avons également observé que la résonance du résidu tyrosyle 117 était modulée par cette interaction. Le rôle central de ce résidu hautement conservé dans la stabilisation du substrat, afin d'assurer une bonne orientation de ce dernier dans la poche catalytique de Wzb, a été confirmé par le fait que l'activité phosphotyrosine-phosphatase de Wzb est largement diminuée lorsque ce résidu est muté en alanine.

Pour conclure, nous avons montré, dans cette étude, les premières évidences mécanistiques de l'interaction entre une BY-kinase, Wzc, et sa phosphotyrosine-phosphatase associée, Wzb. Ces travaux constituent également une première avancée au sujet de la reconnaissance par les LMW-PTPs de leurs substrats spécifiques.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. Ranajeet Ghose du City College of New-York et mon travail a principalement consisté au clonage et à la purification des protéines nécessaires, à la réalisation des tests de phosphorylation et à la réalisation et l'analyse des cinétiques enzymatiques.

**Protein Structure and Folding:
Regulatory Interactions between a
Bacterial Tyrosine Kinase and Its Cognate
Phosphatase**



Deniz B. Temel, Kaushik Dutta, Sébastien
Alphonse, Julien Nourikyan, Christophe
Grangeasse and Ranajeet Ghose
J. Biol. Chem. 2013, 288:15212-15228.
doi: 10.1074/jbc.M113.457804 originally published online March 30, 2013

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M113.457804](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.457804)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](#).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 68 references, 18 of which can be accessed free at
<http://www.jbc.org/content/288/21/15212.full.html#ref-list-1>

Regulatory Interactions between a Bacterial Tyrosine Kinase and Its Cognate Phosphatase*

Received for publication, January 29, 2013, and in revised form, March 28, 2013. Published, JBC Papers in Press, March 30, 2013, DOI 10.1074/jbc.M113.457804

Deniz B. Temel^{†§1}, Kaushik Dutta^{¶1,2}, Sébastien Alphonse[‡], Julien Nourikyan^{||}, Christophe Grangeasse^{||}, and Ranajeet Ghose^{†§3}

From the [†]Department of Chemistry, City College of New York, New York, New York 10031, the [§]Graduate Center of the City University of New York, New York, New York 10016, the [¶]New York Structural Biology Center, New York, New York 10027, and the ^{||}Institut de Biologie et Chimie des Protéines, BMSI-UMR 5086, CNRS, Université Lyon 1, Université de Lyon, 69367 Lyon, France

Background: Wzb phosphatase dephosphorylates Wzc tyrosine kinase in *E. coli*.

Results: We have characterized the regulatory interactions between Wzb and Wzc.

Conclusion: Wzb-catalyzed Wzc dephosphorylation relies on the increased local concentration of substrate due to mutual docking interactions.

Significance: Structural elements that mediate the interactions between a bacterial tyrosine kinase and its cognate phosphatase have been ascertained for the very first time.

The cyclic process of autophosphorylation of the C-terminal tyrosine cluster (YC) of a bacterial tyrosine kinase and its subsequent dephosphorylation following interactions with a counteracting tyrosine phosphatase regulates diverse physiological processes, including the biosynthesis and export of polysaccharides responsible for the formation of biofilms or virulence-determining capsules. We provide here the first detailed insight into this hitherto uncharacterized regulatory interaction at residue-specific resolution using *Escherichia coli* Wzc, a canonical bacterial tyrosine kinase, and its opposing tyrosine phosphatase, Wzb. The phosphatase Wzb utilizes a surface distal to the catalytic elements of the kinase, Wzc, to dock onto its catalytic domain (Wzc_{CD}). Wzc_{CD} binds in a largely YC-independent fashion near the Wzb catalytic site, inducing allosteric changes therein. YC dephosphorylation is proximity-mediated and reliant on the elevated concentration of phosphorylated YC near the Wzb active site resulting from Wzc_{CD} docking. Wzb principally recognizes the phosphate of its phosphotyrosine substrate and further stabilizes the tyrosine moiety through ring stacking interactions with a conserved active site tyrosine.

Tyrosine phosphorylation has been long realized to be a critical signaling mechanism in higher eukaryotes (1) that is

responsible for almost every aspect of cell growth, differentiation, maturation, motility, and regulated cell death. On the other hand, although the existence of tyrosine phosphorylation in bacteria has been known for quite some time (2–4), its influence on bacterial physiology has been largely ignored. However, with mounting evidence of the role of tyrosine kinase signaling in the virulence of many pathogenic bacteria (5–7), its critical role in bacterial cell signaling is gaining prominence (8–11).

The bacterial tyrosine kinase (BY-kinase)⁴ family (10–12) that is highly conserved (13) in both Gram-negative and Gram-positive species constitutes the largest family of protein-tyrosine kinases (PTKs) in bacteria. The central role of BY-kinase-mediated signal transduction in the synthesis and export of polysaccharides responsible for biofilm or capsule formation (9, 10, 12) is well established. In addition, BY-kinases also appear to participate in diverse cellular processes, including antibiotic resistance (14), lysogenization (15), and DNA metabolism (16), indicating that the extent of their influence on bacterial physiology could rival that seen for PTKs in life's critical processes in higher eukaryotes (17).

BY-kinases comprise a periplasmic/extracytoplasmic domain, two trans-membrane helices, and a cytoplasmic catalytic domain (CD) that is structurally distinct from those found in eukaryotic PTKs. Recently solved structures of the CDs of several BY-kinases, including Etk (18) and Wzc (19) (Fig. 1) from *Escherichia coli* and CapB from *Staphylococcus aureus* (20), confirmed their unique features highlighted by an absence of the two-lobed fold characteristic of the CDs of eukaryotic PTKs. Also striking was the close structural similarity of the BY-kinases to P-loop ATPases. BY-kinase CDs possess ATP-binding motifs reminiscent of the Walker motifs of P-loop ATPases instead of eukaryal kinase sequence motifs (21). These motifs include the following (Fig. 1): Walker A ((A/G)XXXXXGK(S/T); usually only the GK(S/T) element is conserved in BY-kinases); Walker B ($\phi\phi\phi\phi$ DXXP, where ϕ is a hydro-

* This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Grants GM084278 and AI101792. This work was also supported by CNRS, Université de Lyon, and the Agence National de la Recherche (ANR-08-BLAN-0143 and ANR-10-BLAN-1303-01). The NMR facilities at City College of New York are partially supported by National Institutes of Health Grants 2G12RR03060 and 8G12MD007603. Facilities at the New York Structural Biology Center are supported by National Institutes of Health Grants CO6RR015495 and P41GM066354; the New York State Office for Science, Technology, and Academic Research (NYSTAR); the Keck Foundation; and the New York City Economic Development Corporation.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence may be addressed: New York Structural Biology Center, 89 Convent Ave., New York, NY 10027. Tel.: 212-939-0660 (ext. 9304); Fax: 212-939-0863; E-mail: dutta@nysbc.org.

³ To whom correspondence may be addressed: Dept. of Chemistry, City College of New York, 160 Convent Ave., New York, NY 10031. Tel.: 212-650-6049; Fax: 212-650-6107; E-mail: rghose@sci.cny.cuny.edu.

⁴ The abbreviations used are: BY-kinase, bacterial tyrosine kinase; PTK, protein-tyrosine kinase; PTP, protein tyrosine phosphatase; LMW-PTP, low molecular weight PTP; CD, catalytic domain; TROSY, transverse relaxation optimized spectroscopy; BisTris, 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol; SPR, surface plasmon resonance; YC, tyrosine cluster.

phobic residue; the XXP sequence is a BY-kinase-specific extension of the Walker B motif); and an additional motif that is similar to a Walker B, called the Walker A' ($\phi\phi\phi\phi\phi\text{DXDXR}$) (11, 22).

Regulation of BY-kinases occurs through the intermolecular autophosphorylation and subsequent dephosphorylation of 3–7 tyrosine residues (the tyrosine cluster (YC)) located on the C-terminal tail (C-tail) (Fig. 1B) of the CD. Based on extensive biochemical and *in vivo* evidence (23), it is apparent that BY-kinases cannot be classified as being in “active” or “inactive” states, as for a majority of eukaryotic kinases, dependent simply on the phosphorylation state of key regulatory residues (24–27). It is also clear that the overall level of YC phosphorylation rather than the quantitative phosphorylation of any specific YC tyrosine is important for activity (28, 29). Thus, the current model for BY-kinase activity suggests that activity is related to the cycling between a state where the YC is highly phosphorylated (YC_{high}) and a state where the level of YC phosphorylation is greatly reduced (YC_{low}); the presence of both of these states is essential in cellular physiology (10).

Generation of the YC_{high} state is achieved by intermolecular autophosphorylation facilitated by the oligomerization of the cytoplasmic CDs of the BY-kinases in which the YC of one subunit (substrate-acting) is inserted into the catalytic site of the neighboring subunit (enzyme-acting) in the oligomer, as in the case of eukaryotic PTKs (30). A highly conserved sequence motif (EXXRXXR) has been shown to be critical in facilitating the self-association of the CDs of the BY-kinases necessary to accomplish trans-phosphorylation. There are three specific lines of evidence for this. (i) This motif has been shown to play a central role in generating the octameric oligomerization state seen in the crystal structures of the CDs of Wzc (19) as well as *S. aureus* CapB (20), hinting at a general mode of oligomerization and trans-phosphorylation. (ii) Although the isolated CDs of BY-kinases are largely monomeric in solution (as will be demonstrated below), analytical gel filtration revealed the presence of a minor population of a high molecular weight species for the CD of a Wzc mutant (K540M) that cannot bind ATP and hence is incapable of generating a YC_{high} state. This high molecular weight species was eliminated by mutating the conserved residues of the EXXRXXR motif to alanine (19). (iii) This same triple mutation reduced the autophosphorylation levels of Wzc (in the context of full-length protein) to around 10% of wild type (19), suggesting its importance for trans-phosphorylation. Although the tendency of the isolated BY-kinase CDs to oligomerize in solution appears to be low, this low self-affinity is likely to be enhanced severalfold in the context of the membrane-bound fully assembled signaling complex that involves additional interactions involving the periplasmic domains and perhaps the membrane segments (31). However, it is to be noted that isolated BY-kinase CDs have been shown to form higher order oligomers *in vivo* (29) using formaldehyde cross-linking. Thus, based on the current state of knowledge, the following hypothesis for BY-kinase regulation may be proposed. An association of the CDs is followed by trans-phosphorylation and generation of a YC_{high} state. The CDs in the YC_{high} state then dissociate to expose the active site (occluded in the oligomeric state) to downstream targets, such as UDP glucose dehydrogenase, a known BY-kinase target in both Gram-negative (32) and Gram-positive species (33). Regeneration of the YC_{low} state of the CD occurs by the action of protein-tyrosine phosphatases (PTPs), and this reinitiates the cycle. There-

fore, this cycling between YC_{high} and YC_{low} states and consequently between associated and dissociated states of the CD appears key for maintaining function (10). Thus, the critical players in sustaining this $\text{YC}_{\text{high}}/\text{YC}_{\text{low}}$ cycle that occurs in the cytoplasm are the bacterial PTPs. Several of these PTPs belong to the low molecular weight protein-tyrosine phosphatase (LMW-PTP, also known as class II PTP) family.

Bacterial LMW-PTPs are wholly cytosolic and eukaryotic-like in overall structure (34–37) (Fig. 2), although they lack several key features considered to be important for substrate recognition in eukaryotes, suggesting unique mechanisms of kinase docking and regulation. Functional BY-kinase/LMW-PTP pairs in bacteria include Wzc/Wzb (38) and Etk/Etp (*E. coli*) (39), Ptk/Ptp (*Acinetobacter johnsonii*) (40), and Yco6/Yor5 (*Klebsiella pneumoniae*) (41), to name a few that have been characterized. Despite extensive genetic and biochemical evidence for the critical role of BY-kinase/LMW-PTP interactions in bacterial tyrosine phosphorylation-mediated signaling, no information is available on the structural elements on BY-kinases that are important for their interactions with LMW-PTPs. Further, although structural work on bacterial PTPs, including the solution structure of *E. coli* Wzb (34), has allowed the generation of specific hypotheses on phosphotyrosine recognition by these enzymes, information on the specific nature of substrate recognition and dephosphorylation is lacking.

Toward our long term goal of characterizing BY-kinase/LMW-PTP interactions that are key in maintaining the critical cycling between YC_{high} and YC_{low} states in terms of structure, dynamics, and mechanism, we have chosen the canonical BY-kinase *E. coli* Wzc and its opposing LMW-PTP, Wzb, as a prototypical BY-kinase/LMW-PTP pair.

wzb and wzc belong to a gene cluster (*cps*) (42) that is responsible for the synthesis and export of the exopolysaccharide, colanic acid (23, 43), an essential component of biofilms and part of a physiological response to osmotic shock, damage to the cellular envelope, desiccation, and similar environmental stress conditions. For example, in the pathogenic enterohemorrhagic *E. coli* (O157:H7), the causative agent of acute hemorrhagic diarrhea, colanic acid protects the bacterial cells from the acidic conditions of gastrointestinal fluid (44). The proper levels and size distribution of colanic acid are therefore essential for resistance and survival under stress, a process that is hindered in cells lacking either YC-phosphorylated Wzc or Wzc dephosphorylated specifically by Wzb (43).

Here, using a variety of biophysical and biochemical methods, including solution NMR spectroscopy, we define for the first time, the structural elements on the catalytic domain of Wzc (Wzc_{CD}) and on Wzb responsible for their mutual interactions. Our results also provide insight into the mechanism by which Wzb recognizes its substrate, the phosphorylated YC of Wzc_{CD} .

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Expression and Purification of Wzc_{CD} and Wzb Constructs Used for Biophysical Studies—wzc_{CD}, wzc_{CDΔC}, and wzb were cloned into pET15b vectors, transformed into *E. coli* BL21 DE3 cells, and purified as described in detail previously (45) for Wzc_{CD} (the various constructs utilized in this study are shown in Fig. 3). All proteins contained a thrombin-cleavable 21-resi-

Interactions between Wzb and Wzc

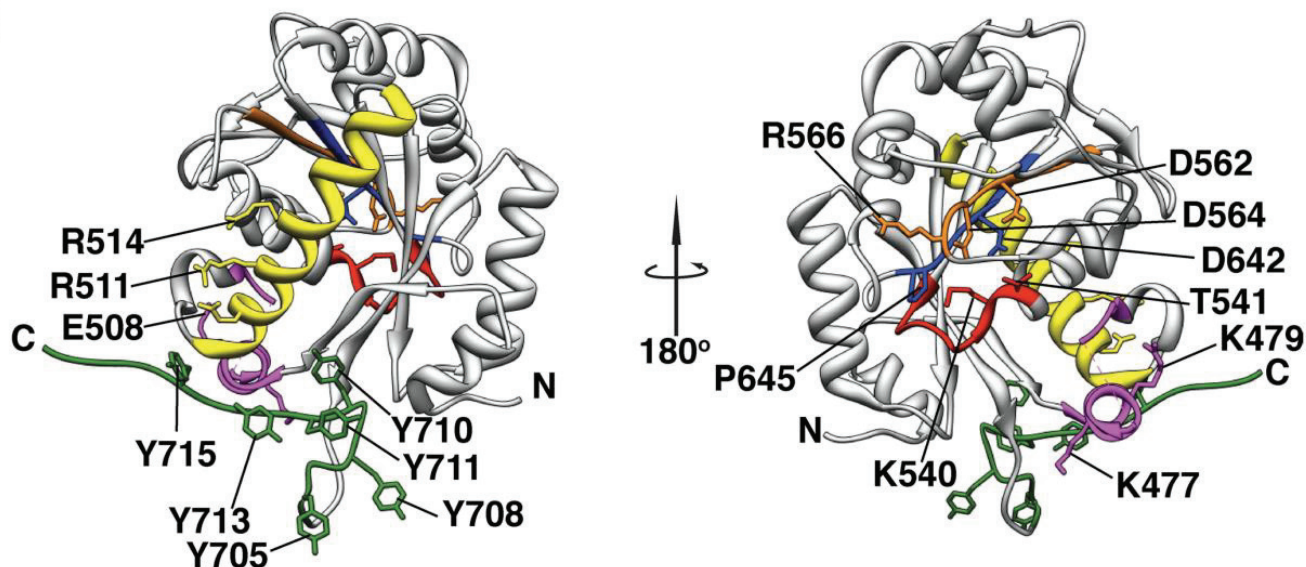
due N-terminal tag. This tag appeared to ensure the long term stability of the proteins for the NMR experiments and was therefore not cleaved. After purification, the Wzc_{CD} and

Wzc_{CDΔC} samples were incubated overnight with a 25-fold excess of ATP/MgCl₂ followed by exchange against NMR buffer (see below) to remove the excess ATP. The wzc_{CD,ERR/A}

A

Wzc <i>E. coli</i> (K12)/447-720	447	-----	S L F N R G I E S P Q V L E -	E H G I S V Y A S I P L S E W Q K A R D S V K T I K -	-----	G I K R Y K Q S Q L L A V G N P T D L A I	E A I R	511
Wzc <i>E. coli</i> (K30)/448-721	448	-----	Q V F L R R G I E S P E Q L E -	E I G I N V Y A S I P I S E W L T K N A R Q S G K -	-----	V R K N Q S D T L L A V G N P A D L A V	E A I R	511
Etk <i>E. coli</i> (C227)/447-726	447	-----	A M L R R G V E A P E Q L E -	E H G I S V Y A T I P M S E W L D K R T R L R K K N L F S N Q Q R H R T K N I P F L A V D N P A D S A V E	-----	K K N I P I L A V K N S D D I A I E	S L R	516
Ptk <i>A. johnsonii</i> /460-733	460	-----	N M M R S G I K D S T Q I E N E L D L P V Y A T V P R S P V Q E S R I N I L K -	-----	-----	K K K N I P I L A V K H S D D I A I E	S L R	517
Wzc <i>A. lwoffii</i> /457-726	457	-----	N M L R T G V K D S T Q I E R E F D L P V Y A T V P R S P V Q E T R M S I L K -	-----	-----	K K S I P I L A V K H S D D I A I E	S L R	517
AmsA <i>E. amylovora</i> /447-726	447	-----	A L F H H G I D N P E Q L E -	E L G L N V Y A S V P L S E W Q R K K D Q E T L L K R -	-----	K L D A R T D P H N R L L A L G N P T D L S I	E A I R	514
AmsA <i>E. pyrifoliae</i> /447-726	447	-----	A L F H H G I D N P E Q L E -	E L G L S V Y A S V P L S E W Q R K K D Q E V Q L K R -	-----	K L A A K V D P H H R L L A L G N P T D L S I	E A I R	514
Wzc <i>K. pneumoniae</i> /447-717	447	-----	V A F H K G V Q S A E Q L E -	E N G L N V Y A S I P L S D W Q L K N V N N S R K K -	-----	D K K F D V L I K E N G A D L A I	E A I R	508
EpsB <i>R. solanacearum</i> /462-751	462	A A F V R N T L F G G I T E P Q D I E E H T G L S V Y A T V P L S D V Q I D L S S Q L T T -	-----	-----	-----	H K R G Q Y L L A R R V P D D P S I E	S L R	528
YwqD <i>B. subtilis</i> /1-237	1	-----	M A L R K N R G -	-----	-----	S R M Q R N V I A M T E P K S L N S E Q Y R	30	
CapB <i>S. aureus</i> /1-230	1	-----	M T N T R -	-----	-----	R S T S S L I V H E Q P K S P I S E K F R	26	
Walker A Walker A' * *								
Wzc <i>E. coli</i> (K12)/447-720	512	S L R T S L H F A M M Q A Q N N V L M M T G V S P S I G K T F V C A N L A A V I S Q T N K R V L L I D C M R K G Y T H E L L G T N N V N G L S E I L I	587					
Wzc <i>E. coli</i> (K30)/448-721	512	G L R T S L H F A M M E A K N N V L M I S G A S P S A G K T F I S S N L A A T I A I T G K K V L F I D A D L R K G Y A H K M F G H K N D K G L S E F L S	587					
Etk <i>E. coli</i> (C227)/447-726	517	A L R T S L H F A M M E T E N N I L M I T G A T P D S G K T F V S S T L A A V I A Q S D Q K V L F I D A D L R R G Y S H N L F T V S N E H G L S E I L A	592					
Ptk <i>A. johnsonii</i> /460-733	521	S M R T A I H F A L S S A R N N L I T I S S P A P E V G K S F I S T N L A T I L A Q S D K R V L I I D A D L R R G Y L H K Y F N L D T O P G L T E L L N	596					
Wzc <i>A. lwoffii</i> /457-726	518	S I R T A I H F S L A S A K N N I L M I A G P A P E V G K S F I S T N L S T I F A Q S D K K V L L I D A D M R R G Y M H K Y F D V D I K P G L S E F L S	593					
AmsA <i>E. amylovora</i> /447-726	515	S L R T S L H F A M M D A Q N N I L M I T G A S P G I G K T F V C A N L A T L V A K T G E K V L F I D G D M R R G Y T H E L L G A E S K T G L S D I L S	590					
AmsA <i>E. pyrifoliae</i> /447-726	515	S L R T S L H F A M M D A E N N I L M V T G A S P G I G K T F I C A N L A T L F A K T G E K V L F I D G D M R R G Y T H D L L G A E S K T G L S D I L S	590					
Wzc <i>K. pneumoniae</i> /447-717	509	G L R T R L Y F A M L E A K N N I L M I S G P S P E I G K T F V S T N L A G V V A Q A G Q K V L L I D A D M R R G Y M H Y F G L P N N G L S E I L T	584					
EpsB <i>R. solanacearum</i> /462-751	529	S L R T A L Q F A M Q D S G N N L V V L T S P T P G V G K S F V S A N L A A V I A T G G K R V L V D A D M R K G Y L H Q Y F G K D R K P G L D L L A	604					
YwqD <i>B. subtilis</i> /1-237	31	T I R T N I E F A S V D R Q M K S V M I T S A C P G E G K S T T A A N L A V V F A Q Q G K K V L L I D A D L R K P T V H T A F F L E N T V G L T S V L L	106					
CapB <i>S. aureus</i> /1-230	27	G I R S N I M F A N P D S A V Q S I V I T S E A P G A G K S T I A A N L A V A Y A Q A G Y K T L I V D G D M R K P T Q H Y I F N L P N N E G L S L L L	102					
*								
Walker B								
Wzc <i>E. coli</i> (K12)/447-720	588	G Q G D I T T A A K P T S I A K F D L I P R G Q V P P N P S E L L M S E R F A E L V N W A S K N Y D L V L I D T P P I L A V T D A A I V G R H V G T T L	663					
Wzc <i>E. coli</i> (K30)/448-721	588	G Q A A A E M I I D K V E G G G F D Y I G R G Q I P P N P A E L L M H P R F E Q L L N W A S Q N Y D L I I D T P P I L A V T D A A I I G R Y A G T C L	663					
Etk <i>E. coli</i> (C227)/447-726	593	G K D E L N K V I Q H F G K G G F D Y I T R G Q V P P N P S E L L M R D R M R Q L L E W A N D H Y D L V I V D T P P M L A V S D A A V V G L L A P A C	668					
Ptk <i>A. johnsonii</i> /460-733	597	G Q Q S L E T V I R H T E V P G L S V I S R G K S P A N P S E L L S S N Q F K N L L E Q M S E K F D H V I I D T P P V L A V T D G I I I S Q Y T G V N L	672					
Wzc <i>A. lwoffii</i> /457-726	594	N Q A E L S Q V I H Q T E V N G L N V I T R G K S P T N P S E M L G S Q K F K A L L D E L S Q Y D H I I I D T P P I L A V T D G I I I S Q Y A G V N L	669					
AmsA <i>E. amylovora</i> /447-726	591	G K L P F N T D L V Q R G D Y G F D F I A R G Q V P P N P S E L L M N S R M K E L V H W A S Q N Y D L V I D T P P I L A V T D A S I I G K L A G T S L	666					
AmsA <i>E. pyrifoliae</i> /447-726	591	G K L P F S T D L V Q R G D Y G F D F I A R G Q V P P N P S E L L M H S R M K E L V D W A S K N Y D L V I D T P P I L A V T D A S I I G K L A G T S L	666					
Wzc <i>K. pneumoniae</i> /447-717	585	G R V D Y E K A V V H T D I A G L D Y I G R G E I P P N P A E L L M G S R I E K F L E W A S G K Y D L V L V D T P P I L A V T D A A I I G R H V G T T L	660					
EpsB <i>R. solanacearum</i> /462-751	605	G D R S I E Q V V H R E V V P G L D F I A T G L F P H N P S E L L L N P R M V E L M D T F R A Q Y D L V L I D T P P V L A V T D T A I L A A R A G T V L	680					
YwqD <i>B. subtilis</i> /1-237	107	K K S S M E Q A V Q A S N E K H L D V L T S G P I P P N P A E L L S S K W M K E L A Y E A C A A Y D M V I F D T P P I L A V A D A Q I L G N V A D G S V	182					
CapB <i>S. aureus</i> /1-230	103	N W S T Y Q D S I I S T E I Q D L D V L T S G P I P N P S E L I T S R A F A N L Y D T L L M N Y F V I I D T P P V N T V D A Q L F S K F T G N V V	178					
Wzc <i>E. coli</i> (K12)/447-720	664	M V A R Y A V N T L K E V E T S L S R F E Q N G I P V K G V I L N S I F R R A S A Y - Q D Y G -	-----	Y Y E Y E Y K S D A K -	-----			720
Wzc <i>E. coli</i> (K30)/448-721	664	L V A R F E K N T V K E I D V S M K R F E Q S G V V V K G C I L N G V V K A S S Y - Y R Y G H N -	-----	H Y G Y S Y D K K -	-----			721
Etk <i>E. coli</i> (C227)/447-726	669	W L R V F G L N T A K E V S L S M Q R L E Q A G V N I K G A I L N G V I K R A S T A - Y S Y G Y N -	-----	Y Y G Y S Y S E K E -	-----			726
Ptk <i>A. johnsonii</i> /460-733	673	V I A R Y A K T Q M K E L E L T L N R F E Q A G V K V N G F I L N D I Q R S S A G Y G Y G Y N -	-----	Y A Y A Y K A N K E S D -	-----			733
Wzc <i>A. lwoffii</i> /457-726	670	L I A R Y S K S Q M K E L E L S L N R F E Q A G V K V N G F I L N D I Q R T A G - -	-----	A G Y S Y N -	-----	Y A Y A Y K A N K E D -		726
AmsA <i>E. amylovora</i> /447-726	667	M V A R F E T N T V K E V E I S Y K R F I Q N G I D I K G I I L N A V R K S A N N - Y G Y G Y D -	-----	Y Y D Y S Y Q Q G E K S -	-----			726
AmsA <i>E. pyrifoliae</i> /447-726	667	M V A R F E T N T V K E V E I S Y K R F I Q N G I E I K G I I L N A V R K S A N N - Y G Y G Y D -	-----	Y Y D Y S Y K Q G E K S -	-----			726
Wzc <i>K. pneumoniae</i> /447-717	661	L V A R F E K N T V K E I D V A K N R L E H S G V I V K G V I L N A V T R K A S N K - Y G E Y -	-----	Y Y E Y E Y K S K E -	-----			717
EpsB <i>R. solanacearum</i> /462-751	681	M V T R F E R S T L G E I R E T I K Q L Q H A N V E R G V V F N A L D P N T Y R Y G Y S R Y G R Y R V Q Y G Y T S K P S A E A E A E S A						751
YwqD <i>B. subtilis</i> /1-237	183	L V I S S G K T E K E Q A A K A K E A L A T C K S K L L G A I M N G K K L S K - H S E Y G Y G T -	-----	K D N F M Q K -	-----			237
CapB <i>S. aureus</i> /1-230	179	V V N S E N N R D E V K K G K L I E A T G A K L L G V T L R N M P K D K S A Y Y A Y G T -	-----	D E S -	-----			230

B



and *wzb*_{C9S} mutants were prepared from *wzc*_{CD} and *wzb*, respectively, using the QuikChange kit (Stratagene), cloned into pET15b, expressed, and purified as the corresponding wild-type proteins.

Expression and Purification of *Wzc*_{CD} Constructs Used for Enzymatic Assays—The DNA fragment encoding for *wzc*_{CD} was PCR-amplified using either the wild-type *E. coli* (K12) DNA or the pQE30-*Wzc*_{cyto}-ERR/A plasmid (19) and cloned into a pQE30 vector between the BamHI and HindIII restriction sites to generate *wzc*_{CD} (or the corresponding mutants: *wzc*_{CD,ERR/A}, *wzc*_{CD,F5}, and *wzc*_{CD,F5,ERR/A}). *Wzc*_{CD,F5} and *Wzc*_{CD,F5,ERR/A}, both bearing N-terminal His₆ tags, were produced in *E. coli* X11-blue cells grown in LB medium supplemented with ampicillin and tetracycline. Overexpression was induced using 0.5 mM isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside for 3 h at 37 °C when the A₆₀₀ reached 0.4, followed by centrifugation for 10 min at 5000 × *g*. The pellet was re-suspended in 5 ml of buffer A (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10% glycerol, and 10 mM imidazole at pH 7.5) containing lysozyme (1 mg/liter), DNase I (6 mg/liter), and RNase A (6 mg/liter) by agitation for 15 min at 4 °C. Cells were lysed by sonication and centrifuged for 30 min at 14,000 × *g* at 4 °C. The supernatant was then mixed with nickel-nitrilotriacetic acid-agarose matrix (Qiagen) and incubated for 30 min at 4 °C under gentle agitation followed by three washes with buffer B (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10% glycerol, and 20 mM imidazole, pH 7.5). The proteins were eluted with buffer E (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10% glycerol, and 150 mM imidazole, pH 7.5). Eluted fractions were analyzed by SDS-PAGE, pooled, and dialyzed overnight against 1 liter of buffer D (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, pH 7.5) and stored at -20 °C. Note that all *Wzc*_{CD} (or mutants thereof) preparations produced as described above resulted in species with a heterogeneously phosphorylated YC (data not shown) in line with that observed for Etk (18) and CapB (20).

Expression and Purification of *Wzb* Constructs Used for Enzymatic Assays—The DNA fragment encoding *wzb* and the mutants *wzb*_{C9S}, *wzb*_{L40A}, *wzb*_{Y117A}, and the double mutant *wzb*_{L40A/Y117A} were PCR-amplified using either the pQE30-*Wzb* plasmid (38) or pQE30-*Wzb*_{L40A} plasmid (created for this study; for the double mutant only) and cloned into a pQE30 vector between the BamHI and Acc65I restriction sites. These mutants bearing N-terminal His₆ tags were produced in *E. coli* X11-blue cells and grown in LB medium supplemented with ampicillin and tetracycline. The overexpression and purification protocol was identical to that described for *Wzc*_{CD} (and variants) above.

***Wzc*_{CD} C-tail Peptides**—Peptides derived from the C-terminal tail of *Wzc*_{CD} were custom-synthesized and HPLC-purified by Peptide2.0. These peptides included (i) WTpep

(⁷⁰⁵YQDYGYEYKSDAK⁷²⁰) (phosphorylatable tyrosine residues are shown in boldface type); (ii) MUTpep (⁷⁰⁵YQDEGEEEEKSDAK⁷²⁰, where the phosphorylatable tyrosine residues in WTpep were mutated to glutamate in order to mimic the charge state of a phosphorylated tyrosine residue); (iii) PHOSpep (⁷¹²EY*E⁷¹⁴, where Y* represents 4-phosphomethylphenylalanine, a non-cleavable phosphotyrosine analog) (46). This peptide was chosen in order to test the affinity of Wzb for a singly phosphorylated species that would be a true mimic of phosphotyrosine and yet would not be cleaved by the enzymatic activity of Wzb.

Surface Plasmon Resonance Measurements—Analyses of the interactions between the different *Wzc*_{CD} and Wzb constructs were performed using surface plasmon resonance (SPR) using a BIAcore X100 (GE Healthcare). All experiments were performed at 25 °C. The buffers for the SPR measurements were filtered through 0.22-μm filters and degassed extensively before use. CM5 (carboxymethylated dextran; GE Healthcare) sensor chips were covalently coated with each of the three ligands *Wzc*_{CD}, *Wzc*_{CDΔC}, and *Wzc*_{CD,ERR/A} (theoretical pI 8.9, 9.39, and 8.73, respectively). The ligands were dissolved to final concentrations of 21 μg/ml in 10 mM sodium acetate (pH 5.3) and immobilized onto CM5 chips by amine coupling on flow cells 2 (FC2), yielding responses of 951.2, 1512.8, and 490.8 for *Wzc*_{CD}, *Wzc*_{CDΔC}, and *Wzc*_{CD,ERR/A}, respectively, after deactivation of the CM5 surface with ethanolamine-HCl. As control, flow cells 1 (FC1) were activated for amine coupling and deactivated under the same conditions as FC2 in the absence of ligand.

The analytes, Wzb and Wzb_{C9S}, were diluted in a buffer containing 50 mM phosphate, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 25 mM DTT, 5 mM EDTA, and 0.005% P20-surfactant at pH 7.4 (SPR buffer), to reach final concentrations ranging from 100 nM to 10 μM. Each experiment consisted of three cycles where only the SPR buffer was passed over the CM5 sensor chip, followed by 11 cycles of different analyte concentrations (with one in duplicate). In each cycle, 50 μl of SPR buffer was injected first to stabilize the base line, followed by injection of the analyte (0–10 μM) through the two flow cells at 30 μl/min for 180 s. Responses detected on FC1 were considered to result from nonspecific binding and subtracted from the binding traces before detailed analyses. Dissociation of the bound analyte was achieved by passing SPR buffer over the two flow cells at 30 μl/min for 600 s. After the dissociation phase, a solution containing 5 M NaCl and 4 M MgCl₂ and another containing 10 mM triethylamine (10 μl/min for 60 s for each) were used to regenerate the CM5-ligand surface. Each experiment was recorded in duplicate, and reproducible signals were detected for every ligand-analyte pair tested.

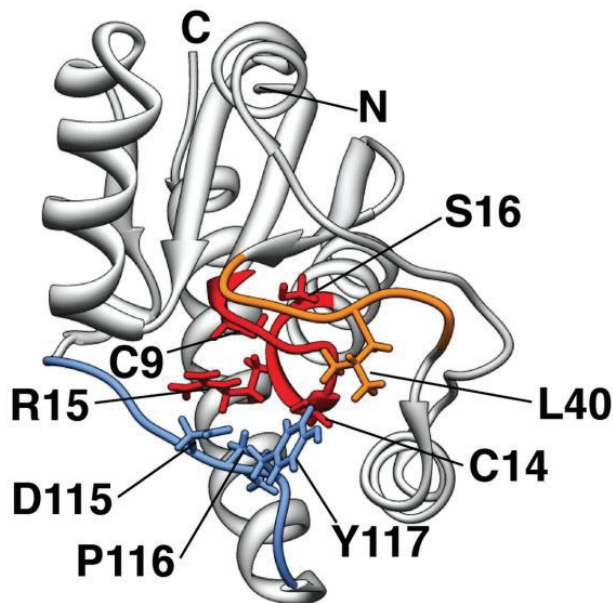
FIGURE 1. BY-kinases. A, sequence alignment for BY-kinases. The conserved BY-kinase sequence motifs are indicated. The location of the α2 helix is shown by the horizontal black line, and the location of the EXRRXR motif is shown by the yellow rectangle with the conserved residues (Glu, Arg, Arg) indicated by the asterisks. This alignment of BY-kinase sequences was used to generate Fig. 6C. B, structure of *Wzc*_{CD} (Protein Data Bank code 3LA6) (19). Conserved structural elements are colored, and the side chains of conserved residues are shown in stick representations and labeled. The characteristic BY-kinase motifs (conserved residues are shown in boldface type) for *Wzc*_{CD} are Walker A (⁵³³GVSPSIGKT⁵⁴¹; red), Walker A' (⁵⁵⁸VLLIDCDMR⁵⁶⁶; orange), and Walker B (⁶³⁹VLIDTPP⁶⁴⁵; blue). Also shown are helix α2, containing the conserved ⁵⁰⁸EAIRSLR⁵¹⁴ motif (yellow); the RK-cluster (Ser⁴⁷³-Leu⁴⁹⁶; magenta) (only Lys⁴⁷⁷ and Lys⁴⁷⁹ are seen in the crystal structure), and the C-tail (green; the YC tyrosines (Tyr⁷⁰⁵, Tyr⁷⁰⁸, Tyr⁷¹⁰, Tyr⁷¹¹, Tyr⁷¹³, and Tyr⁷¹⁵) are shown). The *Wzc*_{CD} orientations are the same as in Fig. 6.

Interactions between Wzb and Wzc

A

	P-loop	W-loop	
Wzb <i>E. coli</i> K12/1-147	1 --- MFNN I LVV CVGNI CRSP	TAERLLQRYHP --- EL --- KVE SAG LGAL - VGKGADP	47
AmsI <i>E. amylovora</i> /1-144	1 --- MINS I LVVC IGINI CRSP	TGERLLKAALP --- ER --- KIA SAG LKAM - VGG SADE	47
Etp <i>E. coli</i> (K12)/1-148	1 - MAQLK FNS I LVV CTGNI CRSP	IGERLLRKRLP --- GV --- KVK SAG VHGL - VKHPADA	51
Yor5 <i>K. pneumoniae</i> /1-144	1 --- MFST I LIV CTGNI CRSP	IGERYLQQLP --- SK --- NIS SAGTQAL - VDHEADQ	47
Ptp <i>A. johnsonii</i> /1-142	1 --- MQFKNI LVV CIGNI CRSP	MAEYLLKQNY --- QL --- TIHSAG I SGM - IGYSADE	48
EpsP <i>R. solanacearum</i> /1-145	1 --- MIKT I LVV CIGNI CRSP	MAQALLHQALP --- GV --- SVI SAG IGAL - SGYPADP	47
YwlE <i>B. subtilis</i> /1-150	1 --- MDI I FVCTGNT CRSP	MAEALFKSIAERELNV --- NVR SAGVFAS - PNGKATP	49
PtpB <i>S. aureus</i> /1-139	1 --- MKI L FVCTGNT CRSP	LAESIAKEVMP --- NH --- QFE SRGI FAV - NNOGVSN	45
Ltp1 <i>S. cerevisiae</i> /1-161	1 MTIEKPKI SVAFIC LGNFCRSP	MAEAI FKHEVEKANLENRFNKIDSFGT SNYHVGE SPDH	60
Stp1 <i>S. pombe</i> /1-156	1 --- MTKN IQV L FVCLGNI CRSP	MAEAVFRNEVEKAGLEARFDTIDSCGT GAWHVGNRPDP	57
MPtpA <i>M. tuberculosis</i> /1-163	1 --- MSDP LHVT FVCTGNI CRSP	MAEKMAFQQLRHRLGDAV - RVT SAGTGNWHVGS CADE	56
PtpA <i>S. aureus</i> /1-154	1 --- MVDVAFVCLGNI CRSP	MAEAIMRQR LKDRNIHDI - KVH SRGTG SWNLGEP PHE	52
HCPTPA <i>H. sapiens</i> /1-157	1 - AEQATKSVL FVCLGNI CRSP	IAEAVFRKLVTDQNI SENW - RVD SAATSGYE IGNPPDY	57
BTPP <i>B. taurus</i> /1-157	1 - AEQVTKSVL FVCLGNI CRSP	IAEAVFRKLVTDQNI SDNW - VIDSGAVSDWNVGRS PDP	57
		*	
Wzb <i>E. coli</i> K12/1-147	48 TAISVA AEHQLSLEGH CARQI	SRRLCRNYDL I LTM EKRIERLCE --- MAPEMRGKVM L F	104
AmsI <i>E. amylovora</i> /1-144	48 TASIV ANEHGVS LQDHVAQQLT	ADMCRDSD L I LVM EKKHIDL VCR --- INP SVRGK TML F	104
Etp <i>E. coli</i> (K12)/1-148	52 TAADVA ANHGVSLEGH AGRKLT	AEAMARNYD L I LAME SEHIAQVTA --- I APEVRGK TML F	108
Yor5 <i>K. pneumoniae</i> /1-144	48 SAVEV ARKNGI SLAGHLGRQFT	SKLSKEYE L I LVM EKNIHQ I SN --- I APEAR GKTML F	104
Ptp <i>A. johnsonii</i> /1-142	49 KAQLCMER IGI DMSPH IAKK	LNAEL LKQAD L I LVM SQNQKH I EQ --- TWP FAKGT FRL	105
EpsP <i>R. solanacearum</i> /1-145	48 SAVEV MAQHGI D I SEHRAQQLT	GS L VNRAD L I LVM DGAQKHE I QA --- RHP SKTGSV FRL	104
YwlE <i>B. subtilis</i> /1-150	50 HAVEAL FEKHIALN - HVSSPL	TEELME SADLV LAMTHQHKQ I IAS --- QFGYRDKVFT L	105
PtpB <i>S. aureus</i> /1-139	46 YVEDLVEEHLAET - TL SQQF	TEADLK - ADI I L TMSY SHKEL I EA --- HFG - LQNHVFT L	99
Ltp1 <i>S. cerevisiae</i> /1-161	61 RTVSI CKQHGVKIN - HKGKQI	KTKH FDEYDI I GMDE SNIN LKKI --- QPEG SKAKVCL F	117
Stp1 <i>S. pombe</i> /1-156	58 RTLEV LKKG IHTK - HLARKL	STSDFKNFYI I FAMD S SNLRN I NRV --- KPQG SRAKVM L F	114
MPtpA <i>M. tuberculosis</i> /1-163	57 RAAGV LRAHG YPTD - HRAAQV	GTEHLAA - D L LVALDRNHAR L LR --- QLGVE AARVRML	110
PtpA <i>S. aureus</i> /1-154	53 GTQKI LNKHN I PFD - GMI SEL -	FEATDDFYI I VAMDQ SNVDN I K S INPN LKGL FKLLE F	110
HCPTPA <i>H. sapiens</i> /1-157	58 RGQSCMKRHG I PMS - HVARQI	T KEDFATFDYI I LCMDE SNLRD LNRKSNQVKNCRAK I ELL	116
BTPP <i>B. taurus</i> /1-157	58 RAVSCLRNHG I NTA - HKARQV	T KEDFVTFDYI I LCMDE SNLRD LNRKSNQVKNCRAK I ELL	116
	D-loop		
Wzb <i>E. coli</i> K12/1-147	105 GHWDNE C --- E I PDPYRK	SRET FAAVYTL LERSARQWAQALNAEQV ---	147
AmsI <i>E. amylovora</i> /1-144	105 GHWINQ --- E IADPYKK	SRDAFEAVYGV LENA AQKWNALSR ---	144
Etp <i>E. coli</i> (K12)/1-148	109 GQWLEQK --- E I PDPYRK	SQDA FEHVYGM LERASQEWAKRLSR ---	148
Yor5 <i>K. pneumoniae</i> /1-144	105 GHWLEQR --- D I PDPYRK	SEEAFA SVFKL I EQSALLWAEKLKA ---	144
Ptp <i>A. johnsonii</i> /1-142	106 GHW - QGK --- N I PDPYQH	QDAFFDET SLL I QT CVADWT KH I ---	142
EpsP <i>R. solanacearum</i> /1-145	105 GEM - DQF --- D I DDPYRK	QVTA FEEALAM I QRGVDAWVPR I RALG ---	145
YwlE <i>B. subtilis</i> /1-150	106 KEYVTGSHG --- DVLDP	FGGSDI I YKQTRDE L EELLRQLAKQLK KDRR ---	150
PtpB <i>S. aureus</i> /1-139	100 HEYVKEA - G --- E V I DDPYGG	TKEMVHTYEE L VSL I LKLDI I C ---	139
Ltp1 <i>S. cerevisiae</i> /1-161	118 GDWNTNDGT VQTI I EDPWYG	IQDFEYNFKQ I TYFSKQFLKKE L ---	161
Stp1 <i>S. pombe</i> /1-156	115 GEYASPG - VSKI	VDDPYGSDG FGDICY IQLVDF SQNFLK SIA ---	156
MPtpA <i>M. tuberculosis</i> /1-163	111 RSFDPRSGTHALDVE	DPYGDHSD FEEVAV I E SALPGLHDWVDER LARNGP S	163
PtpA <i>S. aureus</i> /1-154	111 SNMEESD --- VPD	PYYTN - N FEGVYDMV L S SCDNL I DY I VKDAN LKEG -	154
HCPTPA <i>H. sapiens</i> /1-157	117 GSYDPQK --- QLI I EDPY	YGNDSFETVYQQVRCRAFLEKAH ---	157
BTPP <i>B. taurus</i> /1-157	117 GSYDPQK --- QLI I EDPY	YGNDAFETVYQQVRCRAFLEKVR ---	157
	*		

B



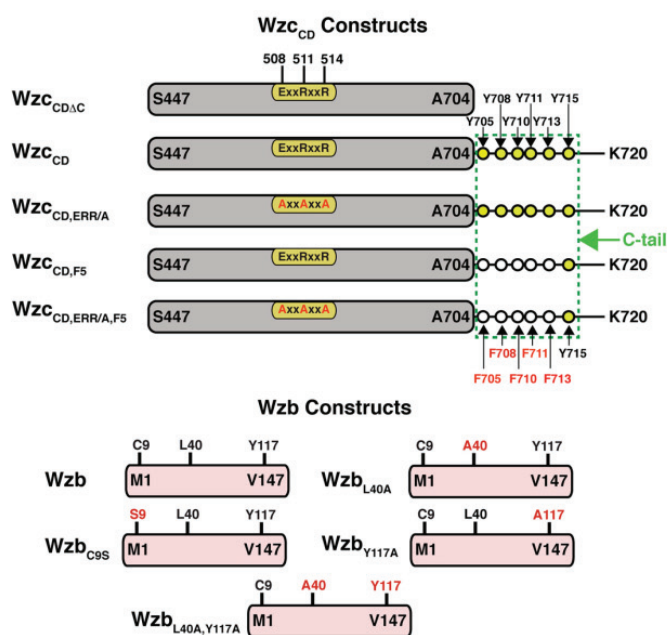


FIGURE 3. Schematic representation of various Wzc_{CD} and Wzb constructs used in this study. The C-terminal tail (Tyr⁷⁰⁵–Lys⁷²⁰) is shown as a green dashed box. The tyrosine residues (yellow filled circles) belonging to the YC are labeled. Residues in the wild-type protein are labeled in black, and the corresponding residues in the mutated protein(s) are labeled in red. The YC tyrosine residues that are mutated to phenylalanine are indicated by open circles.

Transformation of experimental data were performed with the BIA-Evaluation software (GE Healthcare). No detailed kinetic analysis was performed for any of the sensorgrams, and equilibrium analysis to yield affinity values was performed for the Wzc_{CDAC} (ligand)/ Wzb_{C9S} (analyte) pair (also for the Wzc_{CD} / Wzb_{C9S} pair at lower analyte concentrations) for which visual inspection of the sensorgrams confirmed 1:1 Langmuir-type binding. For these sensorgrams, the base line-subtracted ΔRU values were related to the concentration of analyte ($C_{analyte}$) and fitted to Equation 1 to obtain a K_d . The fits were performed using in-house software that utilized the ODRPACK subroutines (47).

$$\Delta RU = \frac{\Delta RU_{max} C_{analyte}}{K_d + C_{analyte}} \quad (\text{Eq. 1})$$

NMR Resonance Assignment—NMR samples used for resonance assignment were typically 300 μM protein (Wzc_{CD} , Wzc_{CDAC} , and Wzb) in a buffer containing 50 mM phosphate, 50 mM NaCl, 25 mM DTT, 5 mM EDTA at pH 6.0 (NMR buffer). NMR experiments were carried out at 25 °C using Bruker Avance (600-, 700-, 800-, or 900-MHz), or Varian Innova (600-MHz) spectrometers equipped with cryogenic probes capable of applying pulse-field gradients along the z axis. NMR data were processed using NMRPipe (48) and analyzed using NMRViewJ (49).

The experimental methodology used for backbone resonance assignments of Wzc_{CD} has been described in detail elsewhere (45). Backbone resonance assignments for Wzc_{CDAC} were obtained using TROSY-based (in all cases) HNCO/HN(CA)CO (512, 32, and 40 complex points with sweep widths of 13.35, 30, and 13 ppm in 1H , ^{15}N , and ^{13}C dimensions, respectively); a HNCA/HN(CO)CA pair (512, 32, and 50/40 complex points with sweep widths of 13.35, 30, and 30 ppm in the 1H , ^{15}N , and ^{13}C dimensions, respectively); and a HNCACB/HN(CO)CACB pair (512, 32, and 40/42 complex points with sweep widths of 13.35, 30, and 65 ppm in 1H , ^{15}N , and ^{13}C dimensions, respectively) (50). No significant chemical shift changes were seen in the core residues of Wzc_{CD} due to tail truncation (to generate Wzc_{CDAC}). Additionally, eight resonances corresponding to the 21-residue N-terminal tag (that includes 6 histidines) were also assigned, and these resonances showed no significant differences in their positions between Wzc_{CD} and Wzc_{CDAC} or for each species in the presence of Wzb . The corresponding tag in Wzb was also unaffected in the presence of Wzc_{CD} or Wzc_{CDAC} .

Nearly complete ^{15}N , ^{13}C , and 1H resonance assignments for full-length Wzb are available from Lescop *et al.* (34). However, due to some differences under our conditions, the assignments of several of these resonances needed to be confirmed. Non-uniformly sampled versions of HNCO/HN(CA)CO (512, 32, and 50 complex points with sweep widths of 13, 32, and 13 ppm in 1H , ^{15}N , and ^{13}C dimensions, respectively); HNCACB/CBCA(CO)NH (512, 32, and 50 complex points with sweep widths of 13, 32, and 65 ppm in 1H , ^{15}N , and ^{13}C dimensions, respectively); and HNCA/HN(CO)CA (512, 32, and 50 complex points with sweep widths of 10, 32, and 30 ppm in 1H , ^{15}N , and ^{13}C dimensions, respectively) were collected using a 30% sampling schedule generated by the *sparse.py* script (51). All data were collected at 700 MHz and 25 °C and reconstructed using MDDGui software (52).

^{13}C , 1H resonance assignments for the aromatic side chains of Wzb were obtained using (H β)C β (C γ C δ)H δ , (H β)C β (C γ C δ C ϵ)H ϵ (512 and 40 complex points with sweep widths of 12 and 30 ppm in 1H and ^{13}C dimensions, respectively) (53) and ^{13}C -edited NOESY-HSQC (512, 40, and 88 complex points with sweep widths of 12, 30, and 12 ppm in the 1H , ^{13}C , and 1H dimensions, respectively) experiments at 700 MHz and 25 °C. A mixing time of 120 ms was used for the ^{13}C -edited NOESY-HSQC experiment.

NMR Titrations to Determine Wzc_{CD} / Wzb Interactions—Chemical shift perturbations in 100 μM uniformly ^{15}N , 2H -labeled Wzc_{CD} or Wzc_{CDAC} (in NMR buffer, described above) were obtained by separate titration sets with 2H -labeled Wzb at concentrations of 25, 50, 75, and 100 μM , and ^{15}N , 1H TROSY spectra were acquired at each titration point. Similarly, 100 μM uniformly ^{15}N , 2H -labeled Wzb (in NMR buffer) was titrated with either uniformly 2H -labeled Wzc_{CDAC} or uniformly 2H -la-

FIGURE 2. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases (LMW-PTPs). A, sequence alignment for LMW-PTPs. Sequences for eukaryotic LMW-PTPs are shown in red. Locations of the P-loop, D-loop, and W-loop are indicated. The Leu⁴⁰ (W-loop) and Tyr¹¹⁷ (D-loop) positions in *E. coli* (K12) Wzb are indicated by the asterisks. The alignment of LMW-PTP sequences was used to generate Fig. 7C. B, structure of Wzb (Protein Data Bank code 2FEK) (34). The P-loop is colored red (3CVGNI CRS¹⁶), the D-loop (with the conserved ¹¹⁵DPY¹¹⁷ sequence shown in a stick representation) is colored blue, and the W-loop (Leu⁴⁰ is shown in a stick representation) is colored orange. The Wzb orientation is the same as in the extreme right-hand panels of Fig. 7, A–C.

Interactions between Wzb and Wzc

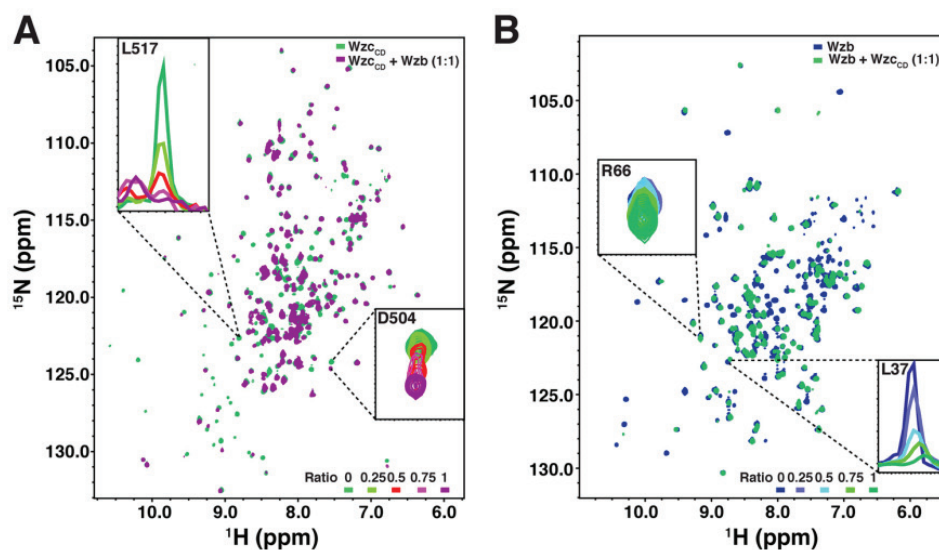


FIGURE 4. Representative spectra for the NMR-based titration sets. *A*, spectral changes in $^{15}\text{N},^1\text{H}$ TROSY spectra (800 MHz) of uniformly $^{15}\text{N},^2\text{H}$ -labeled Wzc_{CD} in the presence of an equimolar amount of uniformly ^2H -labeled Wzb. *B*, spectral changes in $^{15}\text{N},^1\text{H}$ TROSY spectra (800 MHz) of uniformly $^{15}\text{N},^2\text{H}$ -labeled Wzb in the presence of an equimolar amount of uniformly ^2H -labeled Wzc_{CD} . The insets in each case depict representative examples of chemical shift and intensity changes during the course of the titrations (*i.e.* in the presence of increasing amounts of Wzb (*A*) or Wzc_{CD} (*B*)). The molar ratios of the titrant are indicated in the *bottom right* in each case.

labeled Wzc_{CD} at concentrations of 25, 50, 75, and 100 μM , and $^{15}\text{N},^1\text{H}$ TROSY spectra were recorded for each titration point. All spectra were acquired at 900 MHz and 25 $^{\circ}\text{C}$ using sweep widths of 13.35 ppm (512 complex points) and 30 ppm (128 complex points) in the ^1H and ^{15}N dimensions, respectively. Recycle delays of 1.5 s were used, and 16 transients were collected per t_1 point. Representative spectra corresponding to the various NMR-based titrations involving Wzc_{CD} and Wzb are shown in Fig. 4. As can be seen, the spectra are of excellent quality.

Note that for all NMR-based titrations and spin relaxation experiments (described below), the last titration point contained an equimolar ratio of Wzc_{CD} (or $\text{Wzc}_{\text{CD}\Delta\text{C}}$) and Wzb for a total protein concentration of 200 μM . Assuming a K_d of $\sim 2\text{--}5$ μM , we would expect $\sim 80\text{--}85\%$ of the proteins to be in the complexed state. We did not use higher total protein concentration (*i.e.* saturating equivalents) to ensure sample stability during the measurements. However, no significant additional perturbations, compared with those at the equimolar ratio, were seen in the presence of saturating amounts of ligand at lower concentrations of the species being probed.

NMR Titrations to Determine Wzb/Phosphate Interactions—A series of $^{15}\text{N},^1\text{H}$ HSQC spectra were recorded using 100 μM $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -labeled Wzb, each with an incremental amount of potassium phosphate to obtain the following Wzb/phosphate ratios: 1:2, 1:3, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:100, and 1:200. Titrations were performed in a buffer containing 20 mM BisTris, 50 mM NaCl, 25 mM DTT at pH 6.0 (BT buffer). The initial volume of 350 μl increased to 363.5 μl at the end of the addition, resulting in a dilution of less than 4%. All spectra were recorded at 600 MHz at 25 $^{\circ}\text{C}$ using sweep widths of 13 ppm (512 complex points) and 32 ppm (128 complex points) for the ^1H and ^{15}N dimensions, respectively.

NMR Titrations to Determine Wzb/C-tail Peptide Interactions—The WTpep, MUTpep, and PHOSpep peptides were titrated into 100 μM ^{15}N -labeled Wzb in BT buffer to the

following final concentrations: 0, 200, and 400 μM . Individual samples were made for each of the Wzb-WTpep, Wzb-MUTpep and Wzb-PHOSpep complexes, and the following spectra were acquired: $^{15}\text{N},^1\text{H}$ HSQC (512 and 128 complex points with sweep widths of 13 and 32 ppm in the ^1H and ^{15}N dimensions, respectively), constant time $^{13}\text{C},^1\text{H}$ HSQC optimized for the aromatic region (512 and 64 complex points with sweep widths of 12 and 30 ppm in the ^1H and ^{13}C dimensions, respectively), and $^{13}\text{C},^1\text{H}$ HSQC optimized for the methyl region (512 and 115 complex points with sweep widths of 12 and 20 ppm in the ^1H and ^{13}C dimensions, respectively). Only $^{15}\text{N},^1\text{H}$ HSQC spectra were recorded for the Wzb-MUTpep complexes. All spectra were recorded at 800 MHz and 25 $^{\circ}\text{C}$.

In all NMR-based titrations, chemical shift perturbations ($\Delta\delta_i$) or signal attenuations (ΔI_i) for each residue at each titration point (indexed by i) were calculated using the following equations.

$$\Delta\delta_i = \sqrt{(\Delta\delta_{0,H} - \Delta\delta_{i,H})^2 + 0.11(\Delta\delta_{0,N} - \Delta\delta_{i,N})^2} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\Delta I_i = 1 - \frac{I_i}{I_0} \quad (\text{Eq. 3})$$

The 0 subscript indexes the $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ chemical shifts (δ) or the intensities (I) for the reference state (no ligand present).

Spin Relaxation Measurements—TROSY-based relaxation experiments to obtain spin-spin relaxation rates (R_2) (54) were recorded at 800 MHz and 25 $^{\circ}\text{C}$ for Wzc_{CD} , $\text{Wzc}_{\text{CD}\Delta\text{C}}$, and Wzb and for their equimolar mixtures. Samples typically were 100 μM protein in NMR buffer, with the equimolar mixtures containing a 100 μM concentration of each of the constituent proteins. Samples used (and relaxation delays) are provided in Table 1. Relaxation data were acquired with sweep widths of 13.35 ppm (512 complex points) and 30 ppm (128 complex points) in the ^1H and ^{15}N dimensions, respectively, for Wzc_{CD} ,

TABLE 1

Measurement of ^{15}N spin-spin relaxation rates (R_2)

R_2 data were measured for the species in boldface type. All experiments were performed at 800 MHz and 25 °C. Complexes contained an equimolar ratio of the two proteins.

Sample	Relaxation delay
	<i>ms</i>
$^{15}\text{N},^2\text{H}$ -Labeled Wzc_{CD}	0, 16, 33, 49, 65, 82
$^{15}\text{N},^2\text{H}$ -Labeled Wzc_{CD} + ^2H -labeled Wzb	0, 16, 33, 33, 49
$^{15}\text{N},^2\text{H}$ -Labeled Wzc_{CDΔC}	0, 16, 33, 49, 65, 82
$^{15}\text{N},^2\text{H}$ -Labeled Wzc_{CDΔC} + ^2H -labeled Wzb	0, 16, 33, 49, 65
$^{15}\text{N},^2\text{H}$ -Labeled Wzb	0, 16, 33, 49, 65, 98, 131, 163
$^{15}\text{N},^2\text{H}$ -Labeled Wzb + ^2H -labeled Wzc_{CDΔC}	0, 16, 33, 49, 65, 82
$^{15}\text{N},^2\text{H}$ -labeled Wzb + ^2H -labeled Wzc_{CD}	0, 16, 33, 49, 65

Wzc_{CDΔC}, and their equimolar mixtures with Wzb and with sweep widths of 13 ppm (512 complex points) and 30 ppm (128 complex points) in the ^1H and ^{15}N dimensions, respectively, for Wzb and for its equimolar mixtures with Wzc_{CD} and Wzc_{CDΔC}.

Enzymatic Assays—400 μg of Wzc_{CD} (or the corresponding mutant proteins: Wzc_{CD,ERR/A}, Wzc_{CD,F5}, and Wzc_{CD,F5,ERR/A}) was incubated in the presence of 20 μCi of radioactive [γ - ^{32}P]ATP (3000 Ci/μmol) and 25 μM non-radioactive ATP in a buffer containing 25 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT at pH 7.5 for 30 min at 37 °C. This was followed by extensive dialysis in the same buffer to remove radioactive ATP, followed by dephosphorylation using Wzb. For dephosphorylation, Wzc_{CD} (or Wzc_{CD,ERR/A}, or Wzc_{CD,F5}, or Wzc_{CD,F5,ERR/A}) and Wzb were mixed in a buffer containing 100 mM sodium citrate and 1 mM EDTA at pH 6.5 and incubated for a series of times (0, 1, 2, 5, 10, 20, and 30 min) at 37 °C using several kinase/phosphatase molar ratios (5:1, 10:1, 20:1, 25:1, 30:1, and 35:1) with the quantity of Wzb being fixed at 2.85 pmol (in a reaction volume of 128 μl corresponding to a concentration of 22.3 nM). Negative controls for the same times were performed in the absence of Wzb (data not shown). Samples were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. Bands corresponding to radioactive Wzc_{CD} (or Wzc_{CD,ERR/A}, or Wzc_{CD,F5}, or Wzc_{CD,F5,ERR/A}) were cut out from the gels and dissolved in 400 μl of 30% hydrogen peroxide and 200 μl of 60% perchloric acid for 4 h at 80 °C. After the addition of 10 ml of scintillation liquid (ULTIMA GOLDTM XR), the radioactivity was measured in a scintillation counter (Tri Carb 2100 TR, Packard). The cpm values were then converted to pmol of phosphate remaining on Wzc_{CD,F5} (or Wzc_{CD,F5,ERR/A}). Michaelis-Menten parameters (V_{max} and K_m) were estimated using Hanes-Woolf representations (Equation 4). Data analysis was carried out using in-house programs that utilize the ODRPACK (47) subroutines.

$$\frac{C_{\text{substrate}}}{V} = \frac{1}{V_{\text{max}}} C_{\text{substrate}} + \frac{K_m}{V_{\text{max}}} \quad (\text{Eq. 4})$$

To test the activity of the mutant Wzb proteins, γ - ^{32}P -labeled Wzc_{CD} (generated as described above) was incubated for 10 or 25 min in the absence or presence of either Wzb, Wzb_{C9S}, Wzb_{L40A}, Wzb_{Y117A}, or Wzb_{L40A,Y117A}. The mixtures were then analyzed by SDS-PAGE, and the extent of Wzc_{CD} dephosphorylation was ascertained using direct film exposure and scintillation counting as described above.

RESULTS

In Vitro Interaction between Wzc_{CD} and Wzb—As a first step toward detailed characterization of the interaction between Wzc_{CD} and Wzb, we used SPR to estimate the affinity of their association. In all cases, we used Wzc_{CD} (or mutants thereof; see Fig. 3 for the various Wzc and Wzb constructs used in this study) as a ligand affixed onto the sensor chip surface and Wzb (or mutants thereof; see Fig. 3) as an analyte. First, in order to test whether the C-tail of Wzc_{CD} bearing the YC (the phosphorylated YC being the natural substrate of Wzb) is necessary for the Wzc_{CD}/Wzb interaction, we used a Wzc_{CD} construct missing the C-tail (Wzc_{CDΔC}) as ligand. The sensorgram (Fig. 5A) for the Wzc_{CDΔC}/Wzb interaction was biphasic, especially at higher analyte concentrations, suggesting deviations from a simple 1:1 Langmuir-type binding, making it inappropriate for an equilibrium analysis. The curvature of the association stage of the sensorgram was not sufficient (fast association) for a meaningful kinetic analysis; therefore, such an analysis was not attempted for this (or for any other) case. However, when a catalytically inactive mutant of Wzb (Wzb_{C9S}; where Cys⁹, the catalytic cysteine nucleophile, is replaced by serine) (Fig. 3) was used as the analyte, a Langmuir-type behavior (Fig. 5B) was obtained (for the Wzc_{CDΔC}/Wzb_{C9S} interaction), and an equilibrium analysis yielded a K_d value of $5.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$. Sensorgrams corresponding to Wzc_{CD}/Wzb (Fig. 5C) and Wzc_{CD}/Wzb_{C9S} (Fig. 5D) interactions were highly biphasic, displaying a second slow process following the initial fast association. An equilibrium analysis (data not shown) of the Wzc_{CD}/Wzb_{C9S} sensorgram at lower analyte concentrations where the non-Langmuir behavior is less pronounced (for analyte concentration below 5.0 μM) yielded a K_d of $2.3 \pm 0.4 \mu\text{M}$, comparable with that obtained for the Wzc_{CDΔC}/Wzb_{C9S} interaction. Overall, our analysis suggests that a region on Wzc_{CD} distinct from the phosphorylated C-tail provides a majority of the binding energy for the Wzc_{CD}/Wzb interaction.

Binding Site of Wzb on Wzc_{CD}—Next, we attempted to ascertain specific residues on Wzc_{CD} that interact with Wzb, using solution NMR techniques. Taking cue from the SPR results that showed that the YC of Wzc_{CD} did not play a significant role in binding, we analyzed the spectral perturbations induced on a $^1\text{H},^{15}\text{N}$ TROSY spectrum of $^{15}\text{N},^2\text{H}$ -labeled Wzc_{CDΔC} in the presence of an equimolar ratio of full-length, uniformly ^2H -labeled Wzb. In addition to the uniform broadening of Wzc_{CDΔC} resonances due to complex formation, resulting in an increase in overall molecular mass (^{15}N R_2 for apo = $26.4 \pm 5.9 \text{ s}^{-1}$, indicative of a monomer in solution; ^{15}N R_2 in the presence of Wzb at a 1:1 ratio = $41.0 \pm 11.2 \text{ s}^{-1}$, indicating complex formation; data at 800 MHz with 100 μM Wzc_{CDΔC}), specific chemical shift changes and selective resonance attenuation were seen. The largest chemical shift changes were seen on the N terminus of $\alpha 1$ and the C terminus of $\alpha 3$. Some smaller but significant changes were also seen on αA and $\beta 7$. However, an analysis of the selective signal attenuation (indicative of exchange on the intermediate time scale) was far more informative. Resonances corresponding to all of $\alpha 2$ and most of βA , $\beta 1$, $\beta 6$, and $\beta 7$ were completely broadened out in the presence of Wzb. As shown in Fig. 6A, the residues that display chemical

Interactions between Wzb and Wzc

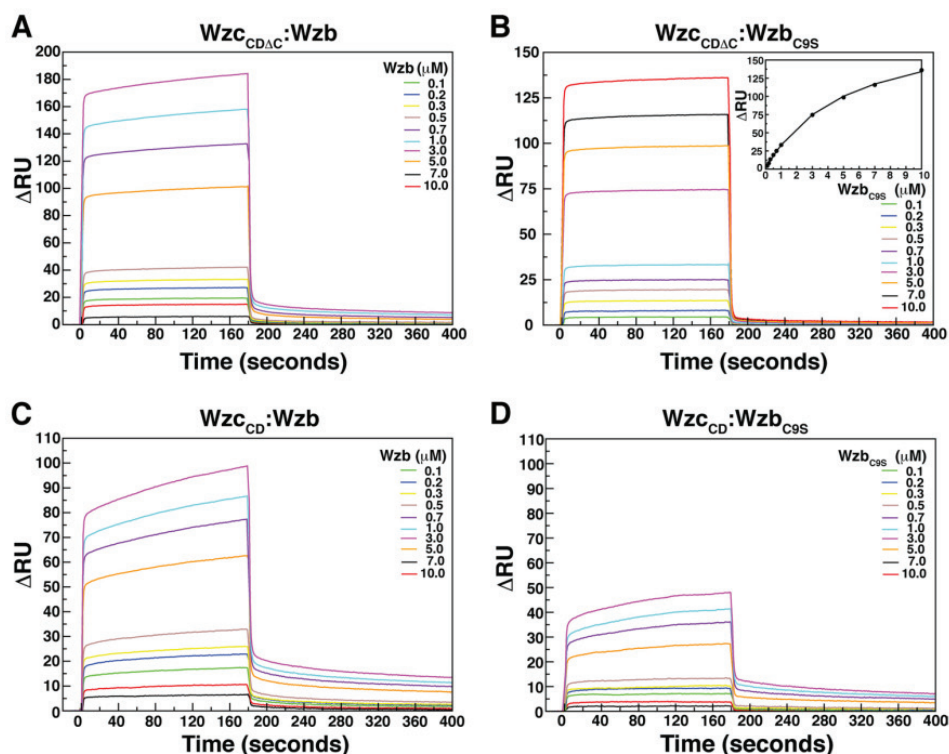


FIGURE 5. SPR analysis of the interactions of Wzc_{CD} with Wzb. Sensorgrams corresponding to the interaction of $Wzc_{CD\Delta C}$ (A and B) or Wzc_{CD} (C and D) at varying concentrations of wild-type Wzb (A and C) or the catalytically dead mutant of Wzb (Wzb_{C9S} ; B and D) are shown. In all cases, the Wzc_{CD} constructs (ligands) were affixed onto the sensor chip surface, and the Wzb constructs were used as analytes. The inset in B depicts the result of the equilibrium analysis for the $Wzc_{CD\Delta C}/Wzb_{C9S}$ interactions. Experimental data are shown as circles, and the theoretical curve corresponding to a 1:1 binding model is shown as a solid line.

shift changes and selective attenuation form a continuous surface on the face opposite to that hosting the catalytic site of Wzc. In fact, no significant spectral perturbations (chemical shift changes or loss of signals) were observed at the active site. Note that ^{15}N , 1H resonances other than those belonging to the Walker B motif are largely assigned for the active site (45).

In order to obtain additional insight into the spectral perturbations, we analyzed a TROSY spectrum of $Wzc_{CD\Delta C}$ in the presence of substoichiometric amounts of Wzb (1:0.25, the first point in our titration course, 1:1 being the last). In this case (*i.e.* for a $Wzc_{CD\Delta C}/Wzb$ ratio of 1:0.25), although no significant chemical shift changes were seen (except for Ile⁵¹⁰; 0.19 ppm), resonances corresponding to almost all of $\alpha 2$ (Ala⁵⁰⁶, Ala⁵⁰⁹, Arg⁵¹¹, Ser⁵¹², Leu⁵¹³, Arg⁵¹⁴, Ala⁵²⁰, and Met⁵²¹) were broadened to below the noise level (average attenuation for $\alpha 2 = 0.80 \pm 0.23$, compared with 0.35 ± 0.29 for all resonances). Complete attenuation of some other resonances (Tyr⁴⁶⁷, Ile⁴⁷⁰, Leu⁵⁴⁷, Leu⁶⁶³, Ala⁶⁶⁶, Ile⁶⁹⁴, and Leu⁶⁹⁵) was seen. Notably, the side chains of these residues lie in close spatial proximity to $\alpha 2$, suggesting the importance of $\alpha 2$ in Wzc/Wzb interactions. NMR titrations with Wzc_{CD} produced similar results (Fig. 6B), again with $\alpha 2$ and spatially proximal regions displaying the largest specific spectral perturbations. $\alpha 2$ shows a degree of sequence conservation that is the highest outside the catalytic site (see Fig. 6C; also see Fig. 1A). Notably, $\alpha 2$ contains the conserved ⁵⁰⁸EXXRXXR⁵¹⁴ that was discussed at length in the Introduction. It therefore appears that the Wzb docking site on Wzc_{CD} overlaps with that shown to play a role in the oligomerization and consequent trans-phosphorylation of the latter.

As expected from the SPR results, minimal spectral perturbations were seen for the YC of Wzc_{CD} . Note that the species probed by the NMR experiments (unlike the SPR results that involved the catalytically dead Wzb_{C9S} mutant) corresponds to the dephosphorylated YC. Given the efficiency of Wzb, the dephosphorylation reaction was almost complete before any NMR data could be recorded (>90% dephosphorylated in 30 min at a 1:1 ratio; data not shown). Nevertheless, some attenuations were seen in the YC, including for Tyr⁷⁰⁸ (0.52), Glu⁷¹⁴ (fully attenuated), and Tyr⁷¹⁵ (0.55). It is possible that this weak interaction of the dephosphorylated C-tail of Wzc_{CD} with Wzb was the cause of the second slow association event seen in the SPR analysis of Wzc_{CD}/Wzb interactions. However, as will be shown, the isolated dephosphorylated C-tail of Wzc_{CD} does not bind Wzb *in trans*. The weak association seen here is due to its elevated local concentration as a result of the docking interaction of Wzb with the putative oligomerization surface of Wzc_{CD} described above. This is also the likely mechanism for substrate (*i.e.* phospho-YC recognition), as discussed below.

Binding Site of Wzc_{CD} on Wzb—As expected, an overall decrease in signal intensity was seen in the ^{15}N , 1H TROSY spectrum of uniformly ^{15}N , 2H -labeled Wzb in the presence of an equimolar amount of uniformly 2H -labeled $Wzc_{CD\Delta C}$ (or 2H -labeled Wzc_{CD}) due to an increase in the molecular mass in solution ($^{15}N R_2$ for free Wzb = $15.6 \pm 4.1 s^{-1}$; $^{15}N R_2$ in the presence of a 1:1 ratio of $Wzc_{CD\Delta C}$ = $31.0 \pm 5.6 s^{-1}$; $^{15}N R_2$ in the presence of a 1:1 ratio of Wzc_{CD} = $41.9 \pm 9.6 s^{-1}$; 800 MHz, 100 μM Wzb). In addition, selective perturbations indicative of specific interaction, were seen covering almost an entire face

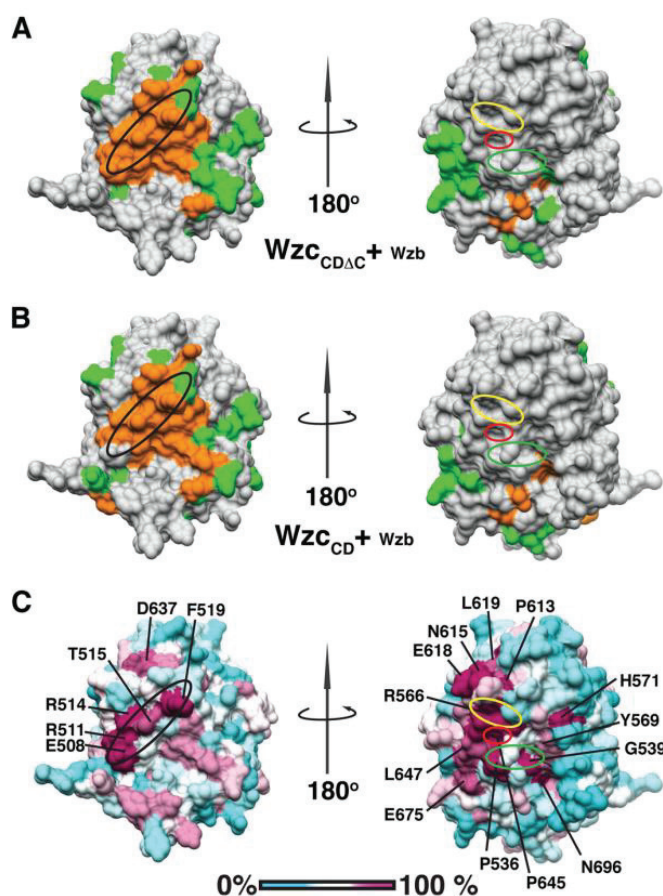


FIGURE 6. Analysis of perturbations in Wzc_{CD} (or Wzc_{CDAC}) spectra in the presence of Wzb . Shown are perturbations in the $^{15}N, ^1H$ TROSY spectra of uniformly $^2H, ^{15}N$ -labeled Wzc_{CDAC} (A) or Wzc_{CD} (B) in the presence of an equimolar ratio of uniformly 2H -labeled Wzb , mapped onto the Wzc_{CD} surface (Protein Data Bank code 3LA6; species probed shown in *larger type*). Residues that display chemical shift changes greater than the mean + 2 S.D. (0.036 ppm for Wzc_{CDAC} ; 0.044 ppm for Wzc_{CD}) are colored green; residues that are broadened to below the noise level are colored orange. C, sequence conservation (also see Fig. 1A) in the CDs of BY-kinases plotted on the Wzc_{CD} surface using a cyan (0% conservation) to magenta (100% conservation) gradient. The EXRRXR (black), Walker A (green), Walker A' (yellow), and Walker B (red) motifs are indicated by the solid ovals.

near the catalytic site of Wzb (Fig. 7). The patterns of perturbations seen in the spectra of Wzb in the presence of either Wzc_{CDAC} or Wzc_{CD} were similar (Fig. 7, compare A and B). Overall, the magnitudes of the chemical shift perturbations were significantly smaller than those seen for Wzc_{CDAC} or Wzc_{CD} in the presence of Wzb , and as in those cases, an analysis of the selective attenuations was far more informative. A majority of resonances corresponding to the N terminus of Wzb , $\beta 1$, $\alpha 3$, $\beta 3$, and $\alpha 4$ were broadened to below the noise level. Most significantly, many resonances corresponding to the so-called P-loop that contains the CXXXXXR(T/S) (9 CVGNICRS 16) motif (Fig. 2), conserved in all Cys-based phosphatases (37), were significantly perturbed. However, a very interesting pattern emerged upon closer inspection of resonances corresponding to the P-loop of Wzb in the presence of Wzc_{CDAC} (Fig. 7D). Despite the absence of the YC in the Wzc_{CDAC} construct, significant spectral perturbations were noted at the catalytic site of Wzb . Residues that were broadened to below the noise level included the catalytic Cys 9 (that carries out the ini-

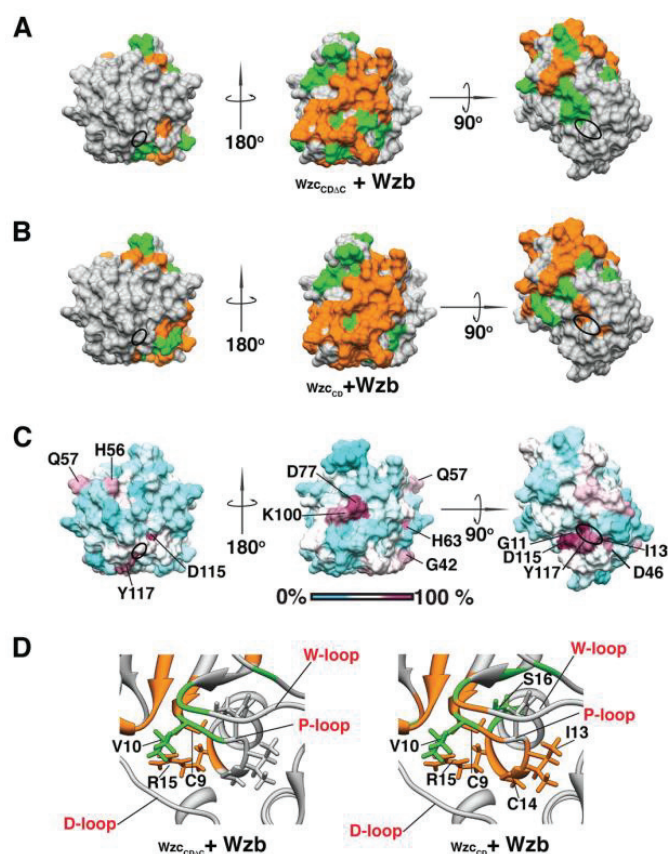


FIGURE 7. Analysis of perturbations in Wzb spectra in the presence of Wzc_{CD} (or Wzc_{CDAC}). Perturbations in the $^{15}N, ^1H$ TROSY spectra of uniformly $^2H, ^{15}N$ -labeled Wzb in the presence of equimolar ratios of uniformly 2H -labeled Wzc_{CDAC} (A) or Wzc_{CD} (B), mapped onto the Wzb surface (Protein Data Bank code 2FEK; species probed shown in *larger type*). Residues that display chemical shift changes greater than the mean + 2 S.D. (0.028 ppm in the presence of Wzc_{CDAC} ; 0.038 ppm in the presence of Wzc_{CD}) are colored green; residues that are broadened to below the noise level are colored orange. C, sequence conservation (also see Fig. 2A) in LMW-PTPs plotted on the Wzb surface using a cyan (0% conservation) to magenta (100% conservation) gradient. D, close-up of the Wzb active site in the presence of either Wzc_{CDAC} (left) or Wzc_{CD} (right). Significant perturbations at the active site in the absence of substrate (*i.e.* the C-tail in the case of Wzc_{CDAC}) indicate allosteric effects upon docking interactions. The P-loop and D-loop containing key catalytic site residues are labeled. Also labeled is the so-called W-loop that, in the case of Wzb , does not contain a tryptophan. Selected residues that depict significant spectral perturbations are shown in stick representations and labeled.

tial nucleophilic attack on the phosphotyrosine moiety) and Arg 15 (that stabilizes the transition state). Given that these changes occur in the absence of substrate (*i.e.* the phosphorylated YC of Wzc), they probably indicate allosteric effects at the Wzb active site upon docking interactions with Wzc_{CDAC} (this could also be the origin of the mildly biphasic behavior of the Wzc_{CDAC}/Wzb sensorgram; see Fig. 5A). Additional perturbations, covering almost all of the P-loop (Fig. 7D), were seen in the presence of Wzc_{CD} . These results suggest a scenario in which docking interactions occur between Wzc_{CD} and Wzb in a YC-independent manner, raising the local concentration of the YC, which then samples the active site of Wzb . This is consistent with the results obtained from the Wzc_{CD} side, as described above.

Substrate Recognition by Wzb —Next, in order to ascertain the key determinants of substrate recognition by Wzb , we monitored changes in $^{15}N, ^1H$ HSQC spectra of ^{15}N -labeled Wzb in

Interactions between Wzb and Wzc

the presence of an increasing concentration of a 16-residue peptide (WTpep) corresponding to the dephosphorylated C-terminal tail (Tyr⁷⁰⁵–Lys⁷²⁰). Lack of any significant spectral perturbations (data not shown) confirmed the extremely low affinity in *trans* of the dephosphorylated C-tail of Wzc_{CD} for Wzb. Additionally, no significant spectral perturbations were seen in the presence of another 16-residue peptide (MUTpep; WTpep carrying a Y708E/Y710E/Y711E/Y713E/Y715E mutation to mimic the charge state of the fully phosphorylated YC). *In vivo* the YC has been found to be multiply phosphorylated (20, 23, 28), and this highly phosphorylated YC is the natural substrate of Wzb. It therefore follows that Wzb is capable of organizing several negative charges near its active site. Hence, that Wzb does not bind MUTpep is due to the fact that glutamate, although an excellent mimic for phosphoserine or phosphothreonine, is an extremely poor mimic for phosphotyrosine (55). However, significant spectral perturbations were seen in the presence of phosphate. A large number of chemical shift changes (>0.04 ppm; Fig. 8A) were seen emanating from the active site of Wzb in the presence of a 5-fold excess of phosphate. Interestingly, resonances corresponding to Cys⁹, Val¹⁰, Glu²⁰, Leu⁴⁰, and Tyr¹¹⁷ only appear in the presence of a large excess of phosphate (200-fold excess under our experimental conditions), whereas additional resonances corresponding to residues Gly¹¹, Ile¹³, Cys¹⁴, and Arg¹⁵ can only be seen in phosphate buffer. The appearance of additional resonances in the presence of phosphate has been noted by Lescop *et al.* (34) (Note that the titrations involving Wzc_{CD}, Wzc_{CDAC}, and Wzb, described earlier were carried out in phosphate buffer; this was to allow the analysis of spectral perturbations for several resonances at the Wzb active site that are exchange-broadened and not observable in the absence of phosphate, as described above; see “Experimental Procedures”). It therefore appears that the phosphate moiety plays a significant role in substrate recognition by Wzb. It is to be noted that Wzb has no activity toward phosphoserine or phosphothreonine,⁵ although selectivity toward phosphotyrosine is probably obtained in part by the depth of the catalytic cavity of Wzb (phosphoserine and phosphothreonine side chains are not long enough to reach the catalytic elements), and additional stabilization of the large hydrophobic tyrosine moiety near the active site is required for stable processing following phosphate recognition.

In order to ascertain the origin of the selectivity of Wzb toward phosphotyrosine, one would ideally use a peptide phosphorylated on a single tyrosine. However, such a phosphotyrosine peptide, being a natural substrate for Wzb, would be efficiently dephosphorylated before any NMR experiments could be conducted. Therefore, we monitored the spectral perturbations in Wzb in the presence of a tripeptide, EY*E (PHOSpep, where Y* represents 4-phosphomonomethylphenylalanine). The choice of this peptide incorporating an unnatural amino acid was guided by the fact that it truly mimics a phosphotyrosine (in a way that glutamate does not) in that it contains both a phosphate group and an aromatic ring. Additionally, being non-cleavable, it is stable under the enzymatic

activity of Wzb. Despite the fact that the YC has been found to be multiply phosphorylated *in vivo*, as discussed earlier, the overall size of the Wzb catalytic cavity ensures that it cannot accommodate more than one phosphotyrosine at any given time, a condition that is effectively simulated by PHOSpep.

Unlike in the case of phosphate, where a large number of chemical shift changes were seen, suggesting chemical exchange on the fast time scale (as expected from a K_d value of $630 \pm 118 \mu\text{M}$ obtained by fitting the chemical shift changes against phosphate concentration), PHOSpep generated significant changes in intensity without any major chemical shift changes. In addition, several peaks showed doubling, with one peak reducing in intensity and the other increasing in intensity with increasing PHOSpep concentration, indicative of slow exchange on the chemical shift time scale (Fig. 8B). Fitting the changes in intensity with PHOSpep concentration yields a K_d of $261 \pm 65 \mu\text{M}$, suggesting an affinity that is comparable with that seen for phosphate alone. This reinforces the fact the majority of the binding affinity of Wzc_{CD} for Wzb is provided by docking interactions that do not involve the YC. A point to note is that the slow exchange regime seen here, although unusual for the weak affinity, is however not unprecedented (56, 57). This apparent anomaly could be due to an unusual k_{on} or the result of a slow conformational change following the binding event. Here we analyze these effects only qualitatively in the context of YC recognition; a more detailed analysis, not relevant in the present context, is left for future studies. Overall, the spectral perturbations seen in Wzb in the presence of PHOSpep are similar to those seen with phosphate alone. However, PHOSpep induces a larger degree of spectral perturbations, in relative terms, on helix $\alpha 5$ of Wzb compared with phosphate (Fig. 8, compare A and C). This helix includes two aromatic residues, Phe¹²⁴ (minimal perturbation, although the flanking residues Thr¹²³ and Ala¹²⁵ have attenuations of 0.40 and 0.46, respectively) and Tyr¹²⁸ (attenuation = 0.43; in fact, the stretch between Tyr¹²⁸ and Leu¹³¹ shows an average attenuation of 0.51), which are highly conserved in bacterial LMW-PTPs (see Fig. 2A). The perturbations in these regions and the suggestion that the D-loop Tyr¹¹⁷ contributes to substrate recognition open the possibility that a reorientation of $\alpha 5$ increases base-stacking interactions with the phosphotyrosine moiety. As stated earlier, the ¹⁵N, ¹H resonance corresponding to Tyr¹¹⁷ can only be seen at high phosphate concentration. In order to probe the role of Tyr¹¹⁷, and possibly of Phe¹²⁴ and Tyr¹²⁸, in substrate stabilization, we analyzed ¹³C, ¹H HSQC spectra, focusing specifically on the aromatic groups (Fig. 9A). The aromatic resonances corresponding to Phe¹²⁴ were weak and could not be analyzed. However, significant attenuations were seen for the δ - and ϵ -resonances corresponding to Tyr¹¹⁷ in the presence of PHOSpep, although none of the resonances corresponding to Tyr¹²⁸ displayed any significant perturbations. No detectable perturbations for any of the aromatic resonances were seen in the presence of WTpep (Fig. 9B). Therefore, it seems likely that Tyr¹¹⁷ does play a role in substrate recognition, although no definitive conclusion can be reached for the role of Phe¹²⁴. As alluded to earlier by Lescop *et al.* (34), Leu⁴⁰ in the so-called W-loop superimposes well on the specific resi-

⁵ C. Grangeasse, unpublished data.

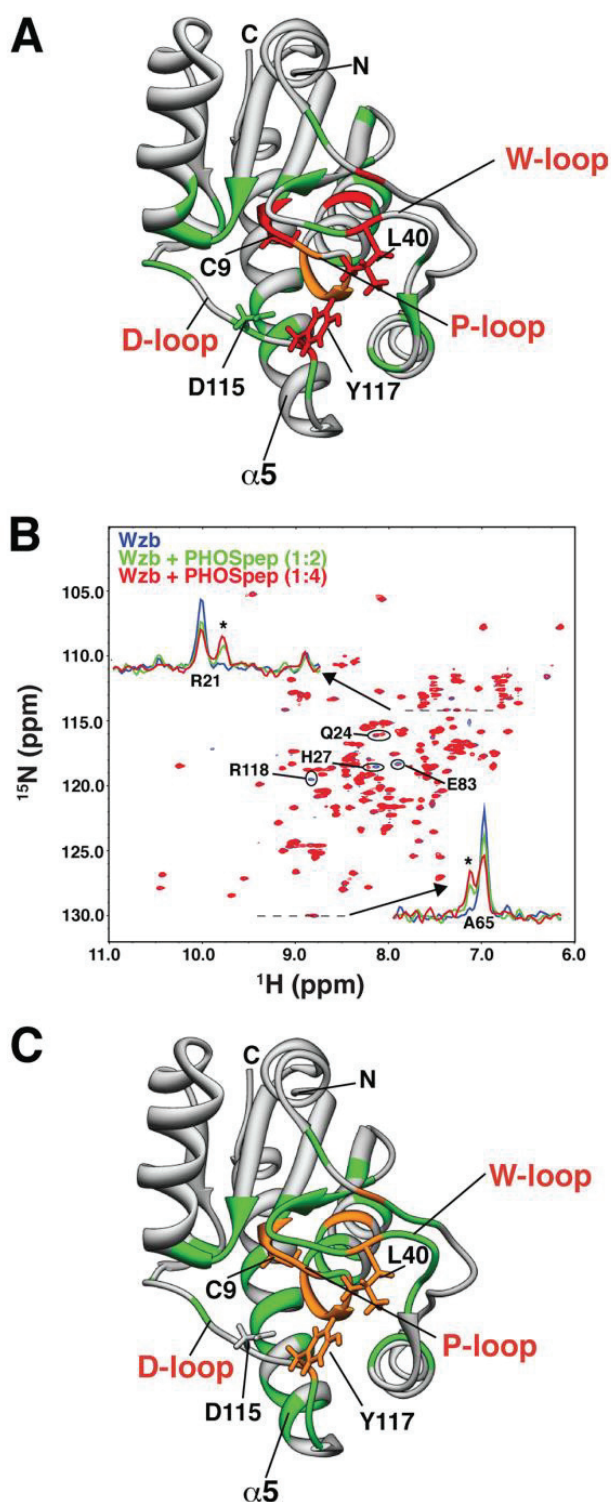


FIGURE 8. Substrate recognition by Wzb. *A*, residues that display significant spectral perturbations in the presence of phosphate are mapped onto a ribbon representation of Wzb. Residues that display chemical shift changes greater than 0.04 ppm (mean + 2 S.D.) in the presence of 5 mol eq of phosphate are colored green. Residues for which the corresponding amide resonances can only be seen in the presence of 200 mol eq of phosphate (Cys⁹, Val¹⁰, Glu²⁰, Leu⁴⁰, and Tyr¹¹⁷) are colored red. Backbone amide resonances of Gly¹¹, Ile¹³, Cys¹⁴, and Arg¹⁵ (colored orange) can only be observed in phosphate buffer (50 mM phosphate, 500 mol eq). *B*, although no significant spectral perturbations in ¹⁵N,¹H HSQC spectra of Wzb can be seen in the presence of either WTpep or MUTpep, major perturbations are seen in the presence of PHOSpep (data for 2 and 4 mol eq shown). A small subset of Wzb resonances

that are attenuated in the presence of PHOSpep are circled and labeled. One-dimensional slices through resonances corresponding to Arg²¹ and Ala⁶⁵ demonstrate the appearance of new peaks (indicated by the asterisk) in the presence of increasing concentrations of PHOSpep, indicative of slow exchange on the chemical shift time scale. *C*, spectral perturbations from *B* (for 4 mol eq of PHOSpep) are mapped onto a ribbon representation of Wzb. Residues for which the backbone amide resonances display attenuations of more than 0.38 (averaged over two independent measurements, greater than the mean + 3 S.D.) in the presence of the peptide are colored green. Residues that are not observable due to exchange broadening (Cys⁹, Val¹⁰, Gly¹¹, Ile¹³, Cys¹⁴, Arg¹⁵, Glu²⁰, Leu⁴⁰, and Tyr¹¹⁷) are colored orange. Key residues discussed in this work are labeled. Helix α_5 , which shows an increase in spectral perturbations (in relative terms) in the presence of PHOSpep compared with phosphate (*A*), is also labeled.

dues in eukaryotic LMW-PTPs that have been shown to play a central role in substrate recognition. Although the ¹⁵N,¹H resonances of Leu⁴⁰ are not visible in the absence of phosphate, the methyl positions of Leu⁴⁰ are significantly attenuated in the presence of PHOSpep (Fig. 9C) but not WTpep (Fig. 9D). Thus, our results provide evidence supporting the conjecture (34) that the tyrosine moiety of the substrate phosphotyrosine is stabilized through ring-stacking interactions with a conserved D-loop aromatic residue, and additional stability is imparted through hydrophobic interactions with the W-loop.

In Vitro Dephosphorylation of Wzc_{CD} by Wzb and Role of the EXXRXXXR Motif—In order to ascertain the functional relevance of the NMR-determined binding site for Wzb on Wzc_{CD}, we determined the influence of mutations on the conserved EXXRXXXR motif of Wzc_{CD} on its ability to interact with Wzb and to be dephosphorylated by it. For this purpose, we chose a Wzc_{CD} construct bearing a E508A/R511A/R514A triple mutation (Wzc_{CD,ERR/A}; see Fig. 3). It has been previously shown that *E. coli* cells complemented with this mutant produced 70% less colanic acid when compared with those carrying wild-type Wzc (19). As shown by the sensorgram in Fig. 10A (the scale is the same as in Fig. 5, C and D), Wzc_{CD,ERR/A} appears to bind very weakly to Wzb. In addition, wild-type Wzc_{CD} is dephosphorylated more rapidly by Wzb compared with Wzc_{CD,ERR/A} (*i.e.* ~94% compared with ~69% after a 30-min incubation for a 20:1 ratio) (Fig. 10B). However, not surprisingly, our attempts to quantitatively analyze the dephosphorylation kinetics and obtain K_m and k_{cat} values were unsuccessful, given the multiply (and heterogeneously, as mentioned above) phosphorylated YC. A somewhat meaningful set of results could be obtained assuming the presence of two sets of sites on the YC: one set that could be dephosphorylated by Wzb in a highly efficient fashion and a second set that is dephosphorylated with lower efficiency (data not shown). This behavior is somewhat evident by the biexponential behavior displayed by the curves shown in Fig. 10B. To obtain more quantitative K_m and k_{cat} values, we created Wzc_{CD} and Wzc_{CD,ERR/A} mutants that contain a single phosphorylatable tyrosine on the C-tail. These mutants (Fig. 3), named Wzc_{CD,F5} and Wzc_{CD,ERR/A,F5}, contain a single tyrosine (Tyr⁷¹⁵) in the YC, with all other C-tail tyrosine residues mutated to phenylalanine (Y705F, Y708F, Y710F, Y711F, and Y713F). Tyr⁷¹⁵ from each Wzc_{CD} subunit was found to engage the active site of a neighboring subunit in the crystal structure (19) of the Wzc_{CD} oligomer. Hence, retaining Tyr⁷¹⁵ was the obvious choice for the enzymatic assays. The dephosphorylation data corresponding to these mutants could be fitted to sin-

that are attenuated in the presence of PHOSpep are circled and labeled. One-dimensional slices through resonances corresponding to Arg²¹ and Ala⁶⁵ demonstrate the appearance of new peaks (indicated by the asterisk) in the presence of increasing concentrations of PHOSpep, indicative of slow exchange on the chemical shift time scale. *C*, spectral perturbations from *B* (for 4 mol eq of PHOSpep) are mapped onto a ribbon representation of Wzb. Residues for which the backbone amide resonances display attenuations of more than 0.38 (averaged over two independent measurements, greater than the mean + 3 S.D.) in the presence of the peptide are colored green. Residues that are not observable due to exchange broadening (Cys⁹, Val¹⁰, Gly¹¹, Ile¹³, Cys¹⁴, Arg¹⁵, Glu²⁰, Leu⁴⁰, and Tyr¹¹⁷) are colored orange. Key residues discussed in this work are labeled. Helix α_5 , which shows an increase in spectral perturbations (in relative terms) in the presence of PHOSpep compared with phosphate (*A*), is also labeled.

Interactions between Wzb and Wzc

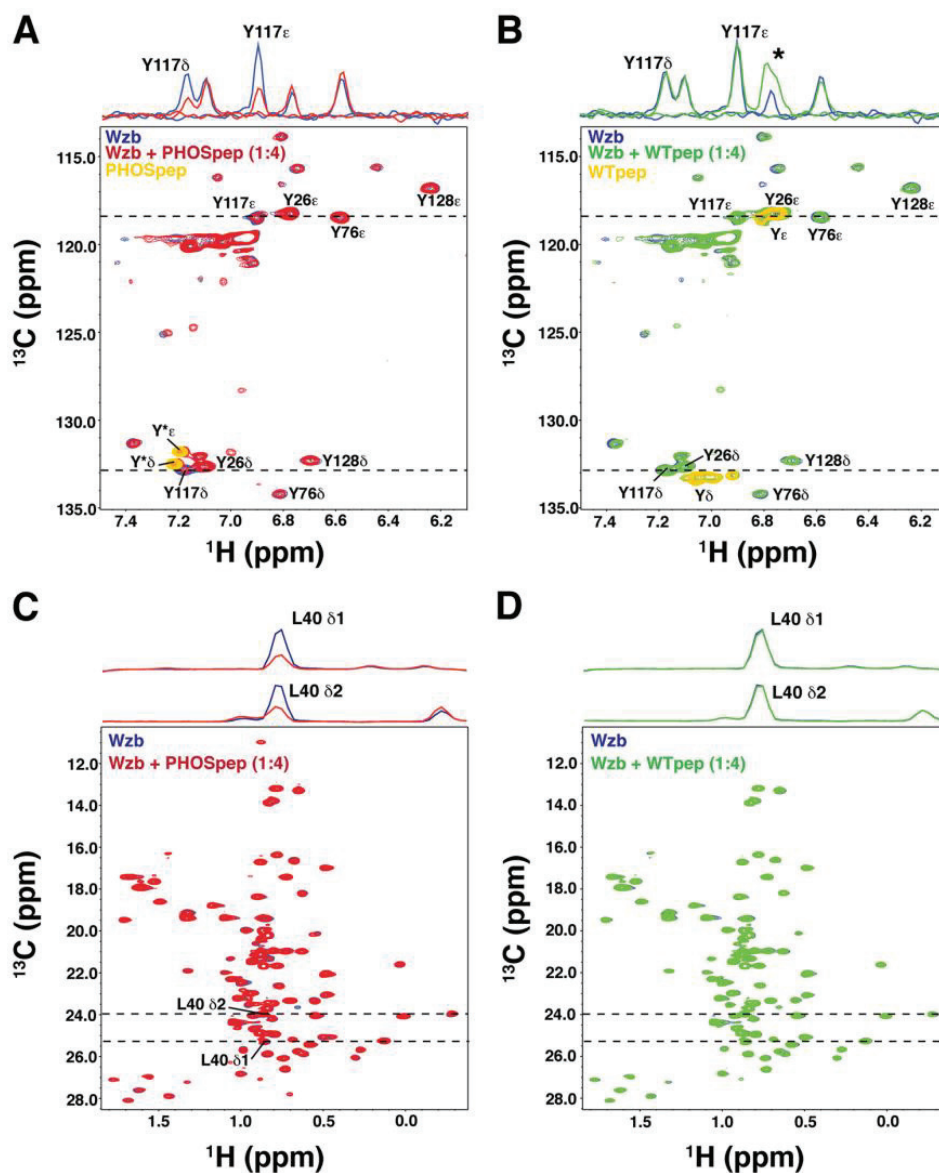


FIGURE 9. Side chain spectral perturbations in Wzb. ^{13}C , ^1H HSQC spectra focusing on the aromatic (A and B) or methyl (C and D) resonances of Wzb in the presence of 4 mol eq of PHOSpep (A and C) or WTpep (B and D). One-dimensional traces (the locations of these traces in the two-dimensional spectra are indicated by the *dashed lines*; the traces for C and D are *expanded* to allow better visualization) of key perturbed resonances are shown *above* the two-dimensional spectra. In all cases, the resonances of Wzb in the apo-state are shown in *blue*, whereas those in the presence of PHOSpep or WTpep are shown in *red* and *green*, respectively. For B, the *asterisk* in the one-dimensional trace represents an overlap of the resonances of free WTpep with that of Y26 ϵ , leading to the illusion of an increase in Wzb resonance intensity in the presence of WTpep. Resonances for the free peptides, PHOSpep (A) (where Y* represents the 4-phosphomonomethylphenylalanine moiety) and WTpep (B), are shown in *yellow* in the two-dimensional spectra.

gle-exponential functions (e.g. for a 35:1 kinase/phosphatase ratio, the dephosphorylation rate is $1.81 \pm 0.06 \text{ min}^{-1}$ for $\text{Wzc}_{\text{CD},\text{F5}}$ and $0.28 \pm 0.20 \text{ min}^{-1}$ for $\text{Wzc}_{\text{CD},\text{ERR}/\text{A},\text{F5}}$) (Fig. 10C). Analysis of the enzyme kinetics in a Hanes-Woolf framework (Fig. 10D) confirmed that the decreased dephosphorylation rate was indeed the result of the reduced ability of $\text{Wzc}_{\text{CD},\text{ERR}/\text{A},\text{F5}}$ ($K_m = 0.84 \pm 0.28 \mu\text{M}$) compared with $\text{Wzc}_{\text{CD},\text{F5}}$ ($K_m = 0.04 \pm 0.31 \mu\text{M}$) to form an enzyme-substrate complex with Wzb. On the other hand, the k_{cat} for $\text{Wzc}_{\text{CD},\text{F5}}$ is only ~ 3.5 -fold higher than that for $\text{Wzc}_{\text{CD},\text{ERR}/\text{A},\text{F5}}$. One may therefore conclude that mutations in the conserved EXRXXR motif on the $\alpha 2$ helix of Wzc_{CD} lead to a reduction in its affinity for Wzb, resulting in a decrease in the efficiency of dephosphorylation.

In Vitro Dephosphorylation of Wzc_{CD} by Wzb and Role of the Wzb Residues Leu⁴⁰ and Tyr¹¹⁷—In order to test the importance of the W-loop Leu⁴⁰ and the D-loop Tyr¹¹⁷ in the Wzb catalyzed dephosphorylation of Wzc_{CD} *in vitro*, we created Wzb mutants Wzb_{L40A} , $\text{Wzb}_{\text{Y117A}}$, and the double mutant $\text{Wzb}_{\text{L40A/Y117A}}$. Although the activity of Wzb_{L40A} appeared to be marginally lower than that of wild-type Wzb, $\text{Wzb}_{\text{Y117A}}$ (and the $\text{Wzb}_{\text{L40A/Y117A}}$ double mutant) was significantly less efficient in dephosphorylating Wzc_{CD} (see Fig. 11). This suggests that although Leu⁴⁰ may play a secondary role in interacting with the phosphotyrosine substrate, as suggested by the NMR studies described above, its involvement is less critical than that of Tyr¹¹⁷.

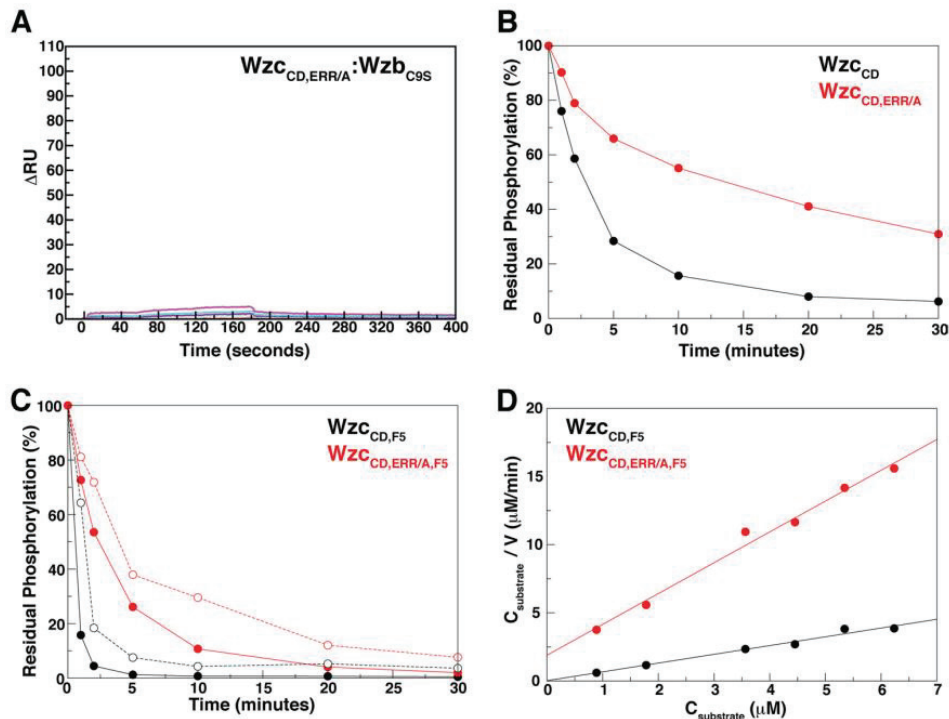


FIGURE 10. **Dephosphorylation of wild-type and mutated Wzc_{CD} by Wzb.** *A*, sensorgram of the interaction of $Wzc_{CD,ERR/A}$ (ligand) with Wzb_{C9S} (analyte) (the scale is the same as in Fig. 5, *C* and *D*). *B*, time course of Wzb-catalyzed dephosphorylation of Wzc_{CD} (black) or $Wzc_{CD,ERR/A}$ (red). Data for a kinase/phosphatase ratio of 20:1 is shown as a representative example. *C*, time course of Wzb-catalyzed dephosphorylation of $Wzc_{CD,F5}$ (black) or $Wzc_{CD,ERR/A,F5}$ (red). Data for kinase/phosphatase ratios of 35:1 (solid lines) and 5:1 (dashed lines) are shown as representative examples. *D*, Hanes-Woolf fits using either $Wzc_{CD,F5}$ (black) or $Wzc_{CD,ERR/A,F5}$ (red) as substrates for Wzb.

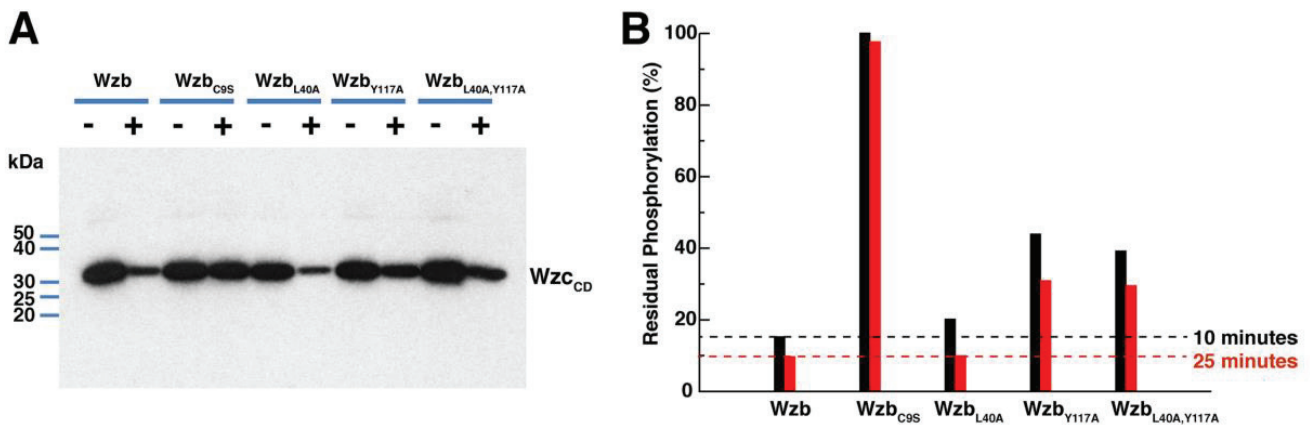


FIGURE 11. **Dephosphorylation of Wzc_{CD} by wild-type and mutated Wzb.** Mutation of Tyr¹¹⁷ on the Wzb D-loop to alanine significantly reduces its ability to dephosphorylate Wzc_{CD} , whereas mutation of the W-loop Leu⁴⁰ to alanine has only a minor effect. Also shown are data for the L40A/Y117A double mutant. Data for the catalytically dead Wzb mutant (Wzb_{C9S}) and wild-type Wzb are also shown for comparison. *A*, autoradiogram obtained after incubation of phosphorylated Wzc_{CD} with Wzb and mutants thereof for a 10-min period. *B*, residual phosphorylation after 10-min (black) and 25-min (red) incubation periods. The intensities are normalized against the 10-min data for Wzb_{C9S} . The dotted lines serve as guides for the residual phosphorylation levels when using wild-type Wzb.

DISCUSSION

Maintenance of the natural equilibrium between the YC_{high} and YC_{low} states of Wzc, a direct result of the activity of the cytosolic LMW-PTP Wzb, appears to be critical for the production of colanic acid and survival under stress (43). Here, we have used a variety of methods to ascertain the structural elements that mediate Wzc/Wzb interactions that are central in regulating the BY-kinase signaling pathway. Using SPR measurements, we have found that a majority of the binding energy for the interactions of Wzc with Wzb is provided by elements external to the phosphorylated YC of the former. Perturbations in solu-

tion NMR spectra reveal that the Wzb binding surface on Wzc involves a region that does not include any of the Wzc catalytic elements but involves the $\alpha 2$ helix bearing a motif (EXXRXXR) that is highly conserved in BY-kinases, in addition to elements that are spatially proximate to it. In fact, most of the perturbations, including and around the EXXRXXR motif, involve extensive line broadening rather than chemical shift perturbations. We attribute these effects to the direct binding event that occurs on the intermediate exchange regime on the chemical shift time scale. The chemical shift perturbations, indicative of fast exchange, occur peripheral to the binding site and likely

Interactions between Wzb and Wzc

represent conformational changes occurring upon Wzb binding. A more detailed parsing of these effects can only be achieved upon the availability of an atomic resolution model of the Wzc_{CD} -Wzb complex and a detailed analysis of the changes in dynamics upon complex formation. The critical role of the EXXRXXR motif in binding Wzb is confirmed by binding studies and biochemical assays, which reveal that mutations in this motif greatly reduce the ability of Wzc_{CD} to interact with and be dephosphorylated by Wzb. As discussed above, many lines of data indicate that the EXXRXXR motif plays a key role in the formation of asymmetric oligomers of Wzc_{CD} , allowing the YC of one molecule to access the catalytic site of another, a necessary condition to allow the intermolecular autophosphorylation. Our present results add a new wrinkle to this model, suggesting that not only does Wzb generate YC_{low} states from the YC_{high} states through its enzymatic activity, but it also probably prevents the reassociation (and consequent phosphorylation) of the Wzc_{CD} monomers. One may speculate that the purpose of this protection is to allow the active site of Wzc_{CD} , which is occluded in the oligomeric state, to be accessible to downstream targets, such as Ugd (32). The studies presented here involve the isolated CD of Wzc. It is quite possible that conformation of Wzc_{CD} and its interactions with Wzb may be modulated by periplasmic events involving the ectodomain of Wzc and indeed its trans-membrane segments. Transmission of extracytoplasmic events through the membrane to modulate the activity of cytoplasmic kinase domains has been extensively investigated in eukaryotic receptor tyrosine kinases, most notably the epidermal growth factor receptor (58, 59). In addition, cytoplasmic events, including post-translation modifications, such as phosphorylation, could also modify the interactions between Wzc_{CD} and Wzb. This mode of regulation has been seen in eukaryotic tyrosine phosphatases. For example, in T-cells, the hematopoietic PTP docks onto the mitogen-activated protein kinase (MAPK), ERK2, using a conserved D-site sequence (60). The hematopoietic PTP stays bound to ERK2 even after dephosphorylating the phosphorylated tyrosine on the activation loop of ERK2 and sequesters the inactive kinase to the cytosol (61). Detachment occurs upon phosphorylation of a D-site serine on hematopoietic PTP by protein kinase A (PKA) (62). This is an intriguing scenario, especially because it has recently been shown that Etp, the cognate LMW-PTP for Etk, is phosphorylated on a D-loop tyrosine by a yet unknown cellular kinase that is neither Etk nor Wzc (63). However, we have not yet found compelling evidence that the corresponding tyrosine (Tyr¹¹⁷) in Wzb is phosphorylated in the cellular milieu.

As mentioned previously, the interaction of Wzb with Wzc_{CD} does not seem to require the phosphorylated YC. The use of motifs for docking interactions external to the substrate moiety to enhance affinity and specificity has been well documented in eukaryotic phosphatases (64, 65). Our results further demonstrate that the catalytic site of Wzb, especially the P-loop bearing the conserved CXXXXXRS motif, undergoes conformational changes upon docking interactions with Wzc_{CDAC} that lacks the YC. This contrasts with interactions on the Wzc_{CD} side that do not seem to display any discernable allosteric effects at its active site. Thus, docking interactions outside

the Wzb catalytic site appear to trigger conformational changes in the catalytic P-loop, perhaps priming it for catalysis. Wzb undergoes significant conformational changes in the presence of phosphate, with most of these changes localized on the catalytic P-loop, on the D-loop, and, to a lesser extent, on the W-loop. Stehle *et al.* (66) have recently solved the structure of MtpA from *Mycobacterium tuberculosis* in the phosphate-free form. This structure, which represents the first LMW-PTP structure in the absence of phosphate, provides a means to compare the conformational changes expected upon phosphate binding given that the crystal structure of MtpA bound to a phosphomimetic chloride ion exists (67). In this study, Stehle *et al.* (66) show that MtpA adopts an open structure in the absence of phosphate with the D- and P-loops more distant from each other, whereas the presence of chloride induces a more closed conformation, greatly reducing the distance between the two loops. The perturbations seen in the Wzb D- and P-loops in our case are consistent with these observations. We further note the presence of extensive conformational exchange in the P-loop in the absence of phosphate, as reflected by the missing resonances. This conformational sampling is greatly reduced in the presence of phosphate, a fact that has also been previously demonstrated (34). Thus, the phosphate group of the phosphotyrosine moiety appears critical in substrate recognition by Wzb. The tyrosine moiety is stabilized largely by ring-stacking interactions with the D-loop tyrosine (Tyr¹¹⁷) and hydrophobic interactions with a W-loop leucine (Leu⁴⁰). Notably, the Tyr¹¹⁷ position is strictly conserved in bacterial LMW-PTPs (Phe¹²⁰ in *Bacillus subtilis*; see Fig. 2A), whereas the Leu⁴⁰ position, although less strictly conserved, always contains a large hydrophobic residue. The central role of Tyr¹¹⁷ in stabilizing the substrate, in what is likely an optimal orientation for catalysis, is confirmed by the fact that the phosphotyrosine phosphatase activity of Wzb is significantly reduced in a Y117A mutant. Considering all of the results presented here, it seems that docking interactions between Wzc and Wzb bring the phosphorylated YC close to the catalytic site of Wzb. Dephosphorylation by Wzb proceeds due to the high local concentration of the substrate, phosphorylated YC, despite the low inherent affinity of Wzb for the isolated phospho-YC. Thus, YC dephosphorylation by Wzb may therefore be appropriately described as proximity-mediated (68).

In conclusion, we have, for the very first time, presented a comprehensive analysis of the interactions between the catalytic domain of the BY-kinase Wzc with its cognate phosphatase, Wzb. We have identified elements within the catalytic domain of Wzc that are crucial for the recognition of Wzb. In addition, our studies provide insight into the recognition by Wzb of the phosphorylated YC of Wzc, its natural substrate. These results represent a major step forward in obtaining a comprehensive understanding of the regulation of the BY-kinase signaling pathway by bacterial PTPs.

Acknowledgments—We thank Dr. Wolfgang Peti (Brown University) and Dr. David Jeruzalmi (City College of New York) for critical comments on the manuscript. We thank Dr. Zimei Bu (City College of New York) for help with the SPR measurements.

REFERENCES

- Hunter, T. (2009) Tyrosine phosphorylation. Thirty years and counting. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 140–146
- Manai, M., and Cozzone, A. J. (1982) Endogenous protein phosphorylation in *Escherichia coli* extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 981–988
- Duclos, B., Grangeasse, C., Vaganay, E., Riberty, M., and Cozzone, A. J. (1996) Autophosphorylation of a bacterial protein at tyrosine. *J. Mol. Biol.* **259**, 891–895
- Grangeasse, C., Doublet, P., Vaganay, E., Vincent, C., Delacutéeage, G., Duclos, B., and Cozzone, A. J. (1997) Characterization of a bacterial gene encoding an autophosphorylating protein tyrosine kinase. *Gene* **204**, 259–265
- Byrne, J. P., Morona, J. K., Paton, J. C., and Morona, R. (2011) Identification of *Streptococcus pneumoniae* Cps2C residues that affect capsular polysaccharide polymerization, cell wall ligation, and Cps2D phosphorylation. *J. Bacteriol.* **193**, 2341–2346
- O'Riordan, K., and Lee, J. C. (2004) *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 218–234
- Morona, J. K., Morona, R., and Paton, J. C. (2006) Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* type 2 is required for invasive disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 8505–8510
- Cozzone, A. J., Grangeasse, C., Doublet, P., and Duclos, B. (2004) Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria. *Arch. Microbiol.* **181**, 171–181
- Grangeasse, C., Cozzone, A. J., Deutscher, J., and Mijakovic, I. (2007) Tyrosine phosphorylation. An emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 86–94
- Bechet, E., Guiral, S., Torres, S., Mijakovic, I., Cozzone, A. J., and Grangeasse, C. (2009) Tyrosine-kinases in bacteria. From a matter of controversy to the status of key regulatory enzymes. *Amino Acids* **37**, 499–507
- Grangeasse, C., Nessler, S., and Mijakovic, I. (2012) Bacterial tyrosine kinases. Evolution, biological function and structural insights. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **367**, 2640–2655
- Grangeasse, C., Terreux, R., and Nessler, S. (2010) Bacterial tyrosine-kinases. Structure-function analysis and therapeutic potential. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 628–634
- Jadeau, F., Bechet, E., Cozzone, A. J., Deléage, G., Grangeasse, C., and Combet, C. (2008) Identification of the idiosyncratic bacterial protein tyrosine kinase (BY-kinase) family signature. *Bioinformatics* **24**, 2427–2430
- Lacour, S., Bechet, E., Cozzone, A. J., Mijakovic, I., and Grangeasse, C. (2008) Tyrosine phosphorylation of the UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance. *PLoS One* **3**, e3053
- Kolot, M., Gorovits, R., Silberstein, N., Fichtman, B., and Yagil, E. (2008) Phosphorylation of the integrase protein of coliphage HK022. *Virology* **375**, 383–390
- Petranovic, D., Michelsen, O., Zahradka, K., Silva, C., Petranovic, M., Jensen, P. R., and Mijakovic, I. (2007) *Bacillus subtilis* strain deficient for the protein-tyrosine kinase PtkA exhibits impaired DNA replication. *Mol. Microbiol.* **63**, 1797–1805
- Jers, C., Soufi, B., Grangeasse, C., Deutscher, J., and Mijakovic, I. (2008) Phosphoproteomics in bacteria. Towards a systemic understanding of bacterial phosphorylation networks. *Expert Rev. Proteomics* **5**, 619–627
- Lee, D. C., Zheng, J., She, Y. M., and Jia, Z. (2008) Structure of *Escherichia coli* tyrosine kinase Etk reveals a novel activation mechanism. *EMBO J.* **27**, 1758–1766
- Bechet, E., Gruszczyc, J., Terreux, R., Gueguen-Chaignon, V., Vigouroux, A., Obadia, B., Cozzone, A. J., Nessler, S., and Grangeasse, C. (2010) Identification of structural and molecular determinants of the tyrosine-kinase Wzc and implications in capsular polysaccharide export. *Mol. Microbiol.* **77**, 1315–1325
- Olivares-Illana, V., Meyer, P., Bechet, E., Gueguen-Chaignon, V., Soulat, D., Lazereg-Riquier, S., Mijakovic, I., Deutscher, J., Cozzone, A. J., Laprévotte, O., Morera, S., Grangeasse, C., and Nessler, S. (2008) Structural basis for the regulation mechanism of the tyrosine kinase CapB from *Staphylococcus aureus*. *PLoS Biol.* **6**, e143
- Hanks, S. K., and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily. Kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576–596
- Jadeau, F., Grangeasse, C., Shi, L., Mijakovic, I., Deléage, G., and Combet, C. (2012) BYKdb. The bacterial protein tyrosine kinase database. *Nucleic Acids Res.* **40**, D321–D324
- Vincent, C., Duclos, B., Grangeasse, C., Vaganay, E., Riberty, M., Cozzone, A. J., and Doublet, P. (2000) Relationship between exopolysaccharide production and protein-tyrosine phosphorylation in gram-negative bacteria. *J. Mol. Biol.* **304**, 311–321
- Cowan-Jacob, S. W. (2006) Structural biology of protein tyrosine kinases. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 2608–2625
- Parsons, S. J., and Parsons, J. T. (2004) Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* **23**, 7906–7909
- Boggon, T. J., and Eck, M. J. (2004) Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* **23**, 7918–7927
- Tsygankov, A. Y. (2003) Non-receptor protein tyrosine kinases. *Front. Biosci.* **8**, s595–s635
- Paiment, A., Hocking, J., and Whitfield, C. (2002) Impact of phosphorylation of specific residues in the tyrosine autokinase, Wzc, on its activity in assembly of group 1 capsules in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 6437–6447
- Doublet, P., Grangeasse, C., Obadia, B., Vaganay, E., and Cozzone, A. J. (2002) Structural organization of the protein-tyrosine autokinase Wzc within *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 37339–37348
- Chen, H., Xu, C.-F., Ma, J., Eliseenkova, A. V., Li, W., Pollock, P. M., Pitteloud, N., Miller, W. T., Neubert, T. A., and Mohammadi, M. (2008) A crystallographic snapshot of tyrosine trans-phosphorylation in action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 19660–19665
- Collins, R. F., Beis, K., Dong, C., Botting, C. H., McDonnell, C., Ford, R. C., Clarke, B. R., Whitfield, C., and Naismith, J. H. (2007) The 3D structure of a periplasm-spanning platform required for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 2390–2395
- Grangeasse, C., Obadia, B., Mijakovic, I., Deutscher, J., Cozzone, A. J., and Doublet, P. (2003) Autophosphorylation of the *Escherichia coli* protein kinase Wzc regulates tyrosine phosphorylation of Ugd, a UDP-glucose dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **278**, 39323–39329
- Mijakovic, I., Poncet, S., Boël, G., Mazé, A., Gillet, S., Jamet, E., Decottignies, P., Grangeasse, C., Doublet, P., Le Maréchal, P., and Deutscher, J. (2003) Transmembrane modulator-dependent bacterial tyrosine kinase activates UDP-glucose dehydrogenases. *EMBO J.* **22**, 4709–4718
- Lescop, E., Hu, Y., Xu, H., Hu, W., Chen, J., Xia, B., and Jin, C. (2006) The solution structure of *Escherichia coli* Wzb reveals a novel substrate recognition mechanism of prokaryotic low molecular weight protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* **281**, 19570–19577
- Hagelueken, G., Huang, H., Mainprize, I. L., Whitfield, C., and Naismith, J. H. (2009) Crystal structures of Wzb of *Escherichia coli* and CpsB of *Streptococcus pneumoniae*, representatives of two families of tyrosine phosphatases that regulate capsule assembly. *J. Mol. Biol.* **392**, 678–688
- Vega, C., Chou, S., Engel, K., Harrell, M. E., Rajagopal, L., and Grundner, C. (2011) Structure and substrate recognition of the *Staphylococcus aureus* protein tyrosine phosphatase PtpA. *J. Mol. Biol.* **413**, 24–31
- Taberner, L., Aricescu, A. R., Jones, E. Y., and Szedlacsek, S. E. (2008) Protein tyrosine phosphatases. Structure-function relationships. *FEBS J.* **275**, 867–882
- Vincent, C., Doublet, P., Grangeasse, C., Vaganay, E., Cozzone, A. J., and Duclos, B. (1999) Cells of *Escherichia coli* contain a protein-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. *J. Bacteriol.* **181**, 3472–3477
- Nadler, C., Koby, S., Peleg, A., Johnson, A. C., Suddala, K. C., Sathiyamoorthy, K., Smith, B. E., Sapre, M. A., and Rosenshine, I. (2012) Cycling of Etk and Etp phosphorylation states is involved in formation of Group 4 Capsule by *Escherichia coli*. *PLoS One* **7**, e37984
- Grangeasse, C., Doublet, P., Vincent, C., Vaganay, E., Riberty, M., Duclos, B., and Cozzone, A. J. (1998) Functional characterization of the low-molecular-mass phosphotyrosine-protein phosphatase of *Acinetobacter johnsonii*. *J. Mol. Biol.* **278**, 339–347

Interactions between Wzb and Wzc

41. Preneta, R., Jarraud, S., Vincent, C., Doublet, P., Duclos, B., Etienne, J., and Cozzone, A. J. (2002) Isolation and characterization of a protein-tyrosine kinase and a phosphotyrosine-protein phosphatase from *Klebsiella pneumoniae*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **131**, 103–112
42. Whitfield, C. (2006) Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 39–68
43. Obadia, B., Lacour, S., Doublet, P., Baubichon-Cortay, H., Cozzone, A. J., and Grangeasse, C. (2007) Influence of tyrosine-kinase Wzc activity on colanic acid production in *Escherichia coli* K12 cells. *J. Mol. Biol.* **367**, 42–53
44. Mao, Y., Doyle, M. P., and Chen, J. (2006) Role of colanic acid exopolysaccharide in the survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastrointestinal fluids. *Lett. Appl. Microbiol.* **42**, 642–647
45. Temel, D. B., Dutta, K., and Ghose, R. (2012) Sequence-specific ^1H , ^{13}C and ^{15}N assignments of the catalytic domain of the *Escherichia coli* protein tyrosine kinase, Wzc. *Biomol. NMR Assign.* DOI 10.1007/s12104-012-9448-0
46. Muratore, K. E., and Cole, P. A. (2007) A lock on phosphotyrosine signaling. *ACS Chem. Biol.* **2**, 454–456
47. Boggs, P. T., Donaldson, J. R., Byrd, R. H., and Schnabel, R. B. (1989) ODRPACK software for weighted orthogonal distance regression. *ACM Trans. Math. Software* **15**, 348–364
48. Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* **6**, 277–293
49. Johnson, B. A. (2004) Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Methods Mol. Biol.* **278**, 313–352
50. Salzmann, M., Pervushin, K., Wider, G., Senn, H., and Wüthrich, K. (1998) TROSY in triple-resonance experiments. New perspectives for sequential NMR assignment of large proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13585–13590
51. Lemak, A., Gutmanas, A., Chitayat, S., Karra, M., Farès, C., Sunnerhagen, M., and Arrowsmith, C. H. (2011) A novel strategy for NMR resonance assignment and protein structure determination. *J. Biomol. NMR* **49**, 27–38
52. Orekhov, V. Y., and Jaravine, V. A. (2011) Analysis of non-uniformly sampled spectra with multi-dimensional decomposition. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **59**, 271–292
53. Yamazaki, T., Forman-Kay, J., and Kay, L. E. (1993) Two-dimensional NMR experiments for correlating $^{13}\text{C}\beta$ and $^1\text{H}\delta/\epsilon$ chemical shifts of aromatic residues in ^{13}C -labeled proteins via scalar couplings. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11054–11055
54. Zhu, G., Xia, Y., Nicholson, L. K., and Sze, K. H. (2000) Protein dynamics measurements by TROSY-based NMR experiments. *J. Magn. Reson.* **143**, 423–426
55. Anthis, N. J., Haling, J. R., Oxley, C. L., Memo, M., Wegener, K. L., Lim, C. J., Ginsberg, M. H., and Campbell, I. D. (2009) β integrin tyrosine phosphorylation is a conserved mechanism for regulating talin-induced integrin activation. *J. Biol. Chem.* **284**, 36700–36710
56. Zuiderweg, E. R. (2002) Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **41**, 1–7
57. Latham, M. P., Zimmermann, G. R., and Pardi, A. (2009) NMR chemical exchange as a probe for ligand-binding kinetics in a theophylline-binding RNA aptamer. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5052–5053
58. Arkhipov, A., Shan, Y., Das, R., Endres, N. F., Eastwood, M. P., Wemmer, D. E., Kuriyan, J., and Shaw, D. E. (2013) Architecture and membrane interactions of the EGF receptor. *Cell* **152**, 557–569
59. Endres, N. F., Das, R., Smith, A. W., Arkhipov, A., Kovacs, E., Huang, Y., Pelton, J. G., Shan, Y., Shaw, D. E., Wemmer, D. E., Groves, J. T., and Kuriyan, J. (2013) Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the EGF receptor. *Cell* **152**, 543–556
60. Bardwell, L. (2006) Mechanisms of MAPK signalling specificity. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 837–841
61. Pettiford, S. M., and Herbst, R. (2003) The protein tyrosine phosphatase HePTP regulates nuclear translocation of ERK2 and can modulate megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Leukemia* **17**, 366–378
62. Saxena, M., Williams, S., Taskén, K., and Mustelin, T. (1999) Crosstalk between cAMP-dependent kinase and MAP kinase through a protein tyrosine phosphatase. *Nat. Cell Biol.* **1**, 305–311
63. Nadler, C., Koby, S., Peleg, A., Johnson, A. C., Suddala, K. C., Sathiyamoorthy, K., Smith, B. E., Saper, M. A., and Rosenshine, I. (2012) Cycling of Etk and Etp phosphorylation states is involved in formation of group 4 capsule by *Escherichia coli*. *PLoS One* **7**, e37984
64. Reményi, A., Good, M. C., and Lim, W. A. (2006) Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 676–685
65. Virshup, D. M., and Shenolikar, S. (2009) From promiscuity to precision. Protein phosphatases get a makeover. *Mol. Cell* **33**, 537–545
66. Stehle, T., Sreeramulu, S., Löhr, F., Richter, C., Saxena, K., Jonker, H. R., and Schwalbe, H. (2012) The apo-structure of the low molecular weight protein-tyrosine phosphatase A (MptpA) from *Mycobacterium tuberculosis* allows for better target-specific drug development. *J. Biol. Chem.* **287**, 34569–34582
67. Madhurantakam, C., Rajakumara, E., Mazumdar, P. A., Saha, B., Mitra, D., Wiker, H. G., Sankaranarayanan, R., and Das, A. K. (2005) Crystal structure of low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.9 Å resolution. *J. Bacteriol.* **187**, 2175–2181
68. Rainey, M. A., Callaway, K., Barnes, R., Wilson, B., and Dalby, K. N. (2005) Proximity-induced catalysis by the protein kinase ERK2. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10494–10495

Discussion & conclusions

Dans la première partie de ce travail, j'ai caractérisé le rôle de l'autophosphorylation de la BY-kinase CpsD dans la synthèse et l'export des polysaccharides capsulaires de la bactérie pathogène *S. pneumoniae*. J'ai tout d'abord confirmé que la séquence C-terminale du modulateur transmembranaire CpsC était nécessaire à son interaction avec CpsD ainsi qu'à l'autophosphorylation de ce dernier comme cela avait été décrit chez *S. aureus* avec l'activateur transmembranaire CapA1 et la BY-kinase CapB2 (Olivares-Illana *et al.*, 2008). A partir de ces observations, nous avons contrôlé la production de capsule dans un mutant n'exprimant pas l'extrémité C-terminale de CpsC. Dans cette souche, la capsule polysaccharidique n'est pas produite tout autour de la bactérie. En effet, la capsule est absente au niveau du site de division. Le même phénotype est observé dans un mutant déficient pour l'expression de CpsD. J'ai également observé que la BY-kinase CpsD délocalisait en absence de l'extrémité C-terminale de CpsC. Ces données montrent que l'interaction entre CpsC et CpsD est non seulement requise pour l'autophosphorylation de CpsD mais également pour sa localisation septale. De plus, la présence de CpsD active au septum est nécessaire pour la synthèse de polysaccharides capsulaires au site de division du pneumocoque. Afin d'étudier plus en profondeur ces défauts de capsule, j'ai localisé la machinerie de synthèse du polysaccharide capsulaire dans ces différentes souches en utilisant la polymérase CpsH comme marqueur du fait de son rôle central au sein de cette machinerie multi-protéique. Cette approche m'a tout d'abord permis de visualiser que, dans une souche sauvage, CpsH est localisée au site de division de la bactérie. Cette observation montre que la synthèse de la capsule est uniquement effectuée au site de division et n'est pas en accord avec l'hypothèse avancée par Henriques et ses collaborateurs (Henriques *et al.*, 2011) proposant l'existence de deux machineries de synthèse. Cette observation implique néanmoins l'existence d'un mécanisme permettant le recouvrement de l'ensemble de la cellule par la capsule produite au site de division. Il a récemment été démontré que le gène *cpsA*, présent dans l'opéron *cps*, code pour une protéine permettant de transférer les précurseurs polysaccharidiques liés à leur transporteur lipidique sur le peptidoglycane (Kawai *et al.*, 2011). Sachant que le peptidoglycane nécessaire à la croissance cellulaire est également produit uniquement au site de division, une hypothèse intéressante serait que la répartition de la capsule tout autour de la cellule soit médiée par l'allongement cellulaire *via* la synthèse de peptidoglycane. J'ai également observé qu'au-delà de la délocalisation de CpsD, CpsH et donc la machinerie de synthèse de la capsule est délocalisée en absence de l'extrémité C-terminale de CpsC. Il semblerait donc que la capsule visible aux anciens pôles de la bactérie puisse correspondre à une synthèse « résiduelle » et être le fruit d'une machinerie de synthèse ne fonctionnant pas de façon optimale du fait de l'absence de

colocalisation de l'ensemble des acteurs. La capsule détectée par notre approche ne serait alors qu'une accumulation de capsule au niveau des zones les plus anciennes de la bactérie.

A partir des observations réalisées chez *E. coli*, qui est la bactérie modèle la plus étudiée pour comprendre les mécanismes de transport du polysaccharide capsulaire, deux modèles de transport des polysaccharides capsulaires ont pu être proposés. Un premier modèle propose que les polysaccharides soient exportés au travers de la membrane interne par l'action d'une flippase dont l'activité n'est pas encore démontrée. Un deuxième modèle propose que l'octamère formé par les BY-kinases dans leur forme non-phosphorylée puisse servir de canal emprunté par le polysaccharide afin de traverser la membrane plasmique (Olivares-Illana *et al.*, 2008 ; Béchet *et al.*, 2010). La capsule polysaccharidique étant un composé très hydrophile il n'est bien évidemment pas concevable qu'il y ait une diffusion passive de ce composé au travers des lipides membranaire. La présence, même résiduelle, de polysaccharides à la surface de la bactérie en absence de CpsD est donc en faveur de la première hypothèse. Ainsi, l'octamère formé par les BY-kinases pourrait servir d'échafaudage pour le recrutement de l'ensemble des composants de la machinerie de synthèse et d'export des polysaccharides. La délocalisation de la polymérase CpsH, en absence de CpsD, est cohérente avec cette proposition.

Dans un second temps, j'ai construit des souches dans lesquelles les résidus tyrosyles du cluster de tyrosines de la BY-kinase CpsD sont remplacés par des phénylalanines ou par des acides glutamiques afin de mimer respectivement une forme non-phosphorylable (CpsD3YF) ou une forme phosphomimétique de CpsD (Cps3YE). J'ai ensuite analysé la synthèse de la capsule polysaccharidique dans ces deux souches. Alors que la souche exprimant la forme phosphomimétique de CpsD semble posséder une synthèse de capsule similaire à la souche sauvage, la souche exprimant la forme non-phosphorylable possède des défauts de synthèse du polysaccharide au niveau du site de division. Comme précédemment, j'ai contrôlé la localisation de ces protéines ainsi que celle de la polymérase CpsH dans ces différentes souches. J'ai pu constater que malgré la bonne localisation septale de CpsD, et ce quel que soit son état de phosphorylation, CpsH est délocalisée lorsque CpsD n'est pas phosphorylée. Ainsi, l'autophosphorylation de CpsD n'est pas nécessaire à sa propre localisation mais semble nécessaire au recrutement et à l'organisation de la machinerie de synthèse du polysaccharide capsulaire au niveau du site de division.

De manière inattendue, j'ai également observé que les souches exprimant la forme non-phosphorylée de CpsD présentait des défauts de division cellulaire. En effet, ces cellules possèdent une longueur largement supérieure à celle de la souche sauvage. Ces observations évoquent le phénotype de filamentation observé dans des bactéries affectées dans leur processus de division (Patel et Weaver, 2006). Quelle pourrait donc être l'origine de ces défauts de division ? Une accumulation de précurseurs polysaccharidiques pourrait induire un tel effet. Cette hypothèse a déjà été avancée par l'équipe du Dr Yother qui a observé que l'inactivation des gènes codant pour la flippase putative CpsJ ou pour la polymérase CpsH n'était possible qu'en présence de mutations suppressives inactivant la glycosyl-transférase CpsE (Xayarath et Yother, 2007). Il a alors été proposé que la létalité de ces mutations soit due à une déstabilisation de la membrane plasmique du fait de l'accumulation d'undécaprénol-phosphate-glucose au sein de cette dernière. Si cette hypothèse ne peut pas être complètement exclue, l'absence de défauts cellulaires dans une souche n'exprimant pas CpsD et le fait que cette mutation ne soit pas létale suggèrent que d'autres raisons sont responsables des défauts de division observés dans la souche *cpsD3YF*. En effet, l'observation de l'ADN chromosomique dans cette souche montre que plus de 30 % des cellules observées présentent une absence ou des défauts de morphologie de son nucléoïde. A partir de ces observations, nous avons émis l'hypothèse que ces défauts de morphologie puissent être le résultat de défauts de ségrégation de l'ADN chromosomique qui, s'il est mal ségrégué, conduirait à un blocage de la constriction du septum par exclusion du nucléoïde.

Afin de vérifier cette hypothèse nous avons analysé la ségrégation de l'ADN chromosomique dans nos différents mutants. Pour ce faire nous avons suivi la mobilité de l'origine de répllication *oriC* du chromosome du pneumocoque en utilisant la protéine ParB comme marqueur. En effet, cette protéine interagit avec les séquences *parS* situées à proximité de *oriC* et est indispensable à la ségrégation des chromosomes fils (Leonard *et al.*, 2005 ; Hester et Lutkenhaus, 2007). Le suivi de la mobilité de ParB a été réalisé par une technique de microscopie haute résolution : la microscopie à fluorescence à réflexion interne totale (TIRF) en collaboration avec le groupe du Pr. Veening de l'Université de Groningen au Pays-Bas. Nous avons observé que la mobilité de ParB est affectée en fonction de l'état de phosphorylation de CpsD. En effet, la protéine ParB est moins mobile dans les cellules exprimant la forme phosphoablative de CpsD que dans celles exprimant la forme phosphomimétique de CpsD. Ainsi, il semblerait que la ségrégation de l'ADN chromosomique soit affectée par l'état de phosphorylation de CpsD.

Il est intéressant de noter que les domaines cytoplasmiques des BY-kinases sont structuralement homologues aux protéines de la famille Mrp/MinD parmi lesquelles on retrouve la protéine ParA. De manière très intéressante, cette protéine, contrôlant la mobilité de ParB dans différents organismes tels que *C. crescentus* et *B. subtilis* (Lim *et al.*, 2014), est absente chez le pneumocoque. Nous avons donc émis l'hypothèse que CpsD pourrait « mimer » une protéine ParA et impacter la ségrégation de l'ADN chromosomique. Différentes propriétés biochimiques de la protéine ParA telle que sa capacité à fixer l'ADN ou encore à interagir avec la protéine ParB ont été décrites (Leonard *et al.*, 2005 ; Hester et Lutkenhaus, 2007 ; Scholefield *et al.*, 2011). Nos expériences ont montré que CpsD, bien qu'incapable d'interagir avec l'ADN, est capable d'interagir avec ParB. J'ai également observé que cette interaction était dépendante de l'autophosphorylation de CpsD. En effet, l'interaction entre ces deux protéines est fortement diminuée lorsque CpsD n'est pas phosphorylée que ce soit *in vitro* comme *in vivo*.

Quelle serait la raison d'être de la fonction « ParA-like » de CpsD ? Un modèle dans lequel la forme non-phosphorylée de CpsD « parasiterait » la fonction de ParB pourrait être proposé. En effet, il est largement établi qu'une souche non-capsulée du pneumocoque, dans laquelle l'ensemble des gènes codant pour la machinerie de synthèse et d'export de la capsule ont été retirés, ne présente aucun problème de division. Le rôle de CpsD dans la division n'est donc pas requis. CpsD ne peut donc en aucun cas être qualifiée de protéine ParA et ne peut pas prétendre à la fonction de la protéine ParA dans la ségrégation des chromosomes. Plusieurs études actuelles montrent que différentes protéines homologues à ParA peuvent agir au niveau de la localisation de différents composants tels que l'appareil de chimiotactisme (Ringgaard *et al.*, 2011) et les facteurs d'assemblage du flagelle (Correa *et al.*, 2005) chez *Vibrio cholerae*, la machinerie de fixation du carbone chez les cyanobactéries (Savage *et al.*, 2010) ou encore les pili de type IV chez *C. crescentus* (Xu *et al.*, 2011). Ainsi, les homologues structuraux des protéines ParA semblent avoir des rôles très variés et spécifiques d'une bactérie à l'autre. Par conséquent, nos observations suggèrent qu'un processus similaire pourrait exister chez le pneumocoque. Ce processus permettrait de positionner la machinerie de synthèse et d'export de la capsule de manière à coordonner la production de cette dernière avec le cycle cellulaire du pneumocoque. Il s'agirait alors d'un mécanisme permettant à la bactérie de s'assurer qu'elle est protégée par sa capsule contre les agressions extérieures avant de se diviser.

Nos différents tests d'interaction montrent une plus grande affinité de ParB pour la forme phosphomimétique de CpsD. Un résultat différent dans lequel la forme non-phosphorylée de CpsD aurait été la plus à même d'interagir avec ParB, interférer avec la ségrégation des chromosomes et ainsi signaler que la synthèse de la capsule n'était pas active, aurait pu être intuitivement anticipé. En effet, il faut garder en tête que l'autophosphorylation de CpsD est requise pour la production de capsule. La présence de CpsD phosphorylée dans la cellule est donc le signe que la synthèse de capsule est effective. A partir de là, un système simple impliquant uniquement CpsD et ParB semble peu probable. En collaboration avec le Dr. Noirot-Gros de l'UMR 1319 MICALIS à Jouy-en-Josas, nous avons d'ores-et-déjà identifié, grâce à une approche de chasse en double hybride en système levure, une protéine de fonction inconnue capable d'interagir avec CpsD et CpsC (résultats non publiés). De plus, certaines observations préliminaires montrent que cette interaction est modulée par la phosphorylation de CpsD (résultats non publiés). De manière intéressante, cette protéine est capable d'interagir avec l'ADN et est retrouvée dans le génome des pneumocoques non-capsulés. A partir de là, on peut imaginer que ce nouveau partenaire puisse participer à la coordination de la production de la capsule avec le cycle cellulaire du pneumocoque. Une hypothèse intéressante et actuellement testée au laboratoire serait que l'interaction entre ce partenaire et CpsD, en fonction de l'état de phosphorylation de CpsD, puisse participer au processus de signalisation.

Une dernière interrogation peut être soulevée : pourquoi le pneumocoque a-t-il besoin de la forme non-phosphorylée de CpsD ? En effet, on observe qu'en présence de la forme phosphomimétique de CpsD, la bactérie se divise correctement et possède une synthèse normale de polysaccharides capsulaires. Une partie de réponse peut être trouvée dans les mécanismes d'infection du pneumocoque. Le pneumocoque colonise le mucus présent au sein du nasopharynx ou des voies respiratoires supérieures de l'hôte. Il peut, dans certains cas, migrer en direction de régions, dites stériles, telles que les voies respiratoires inférieures ou la circulation sanguine. Durant son entrée dans les cavités nasales, le pneumocoque rencontre diverses sécrétions de mucus. A ce stade, la présence de la capsule, ainsi que la charge négative de ses composants, permet au pneumocoque d'échapper à l'emprise de ces sécrétions afin d'atteindre les récepteurs de surface des cellules épithéliales. Néanmoins, lors de l'étape d'adhésion aux cellules épithéliales, la présence de la capsule serait un désavantage du fait de ses propriétés antiadhésives (Weiser *et al.*, 1994). De plus, des études épidémiologiques montrent que des pneumocoques non-capsulés sont abondant dans la population humaine et qu'ils servent de « hubs » pour des

phénomènes de recombinaison afin de générer des résistances aux antibiotiques (Chewapreecha *et al.*, 2014). Ainsi, le pneumocoque aurait besoin d'un mécanisme lui permettant de réguler sa production de capsule afin de réaliser l'ensemble de ces étapes d'infection. Cette hypothèse est en partie confirmée par nos tests de virulence sur les larves de *Galleria mellonella*. Cependant, des tests complémentaires d'adhésion sur des cellules épithéliales eucaryotes ou des tests de virulence sur des organismes plus développés tels que les souris pourraient être réalisés pour tester cette hypothèse de manière plus précise. Par ailleurs, une étude récente a montré que l'activité de la phosphotyrosine-phosphatase CpsB était dépendante du taux d'oxygène présent dans les cultures. Ainsi, en condition de haute concentration en oxygène, l'activité de CpsB est augmentée (Geno *et al.*, 2014). Cette augmentation conduirait alors à une déphosphorylation plus importante de la BY-kinase CpsD. La présence d'un mécanisme de régulation de la synthèse de la capsule polysaccharidique et de la division bactérienne du pneumocoque en fonction du stade de l'infection est, par conséquent, parfaitement envisageable.

Dans la deuxième partie de mon travail, j'ai réalisé une analyse comparative des BY-kinases CapB1 et CapB2 et de leurs modulateurs transmembranaires associés CapA1 et CapA2 de *S. aureus* à partir d'observations structurales. De façon surprenante, il avait été observé que, malgré plus de 70 % de similarité de séquence, seule CapB2 était capable de s'autophosphoryler *in vitro*. De plus, la partie C-terminale de CapA2 était moins efficace que celle de CapA1 pour la stimulation de l'activité autokinase de CapB2 (Soulat *et al.*, 2006). Afin de comprendre ces différents mécanismes, nous avons résolu les structures cristallographiques des chimères CapA1_{cyto}B1 et CapA2_{cyto}B2 et nous les avons comparées à la structure obtenue à partir de la chimère CapA1_{cyto}B2 (Olivares-Illana *et al.*, 2008). Malgré la grande ressemblance entre ces trois structures, quelques motifs pouvant expliquer les différences d'activation de l'autophosphorylation de CapB2, ainsi que l'inactivité de CapB1, ont été identifiés. Les deux principales différences se situent en C-terminal de CapA1, avec la présence d'un résidu glutaminyle supplémentaire qui stabiliserait l'interaction entre cette protéine et CapB2, et en N-terminal de CapB1 et CapB2 avec une séquence de trois résidus aminoacyles successifs différents (KKE et NTR) qui interviendraient également dans l'interaction avec le modulateur transmembranaire. Afin d'étudier l'importance de ces motifs dans l'activation de l'autophosphorylation des BY-kinases ainsi que dans la phosphorylation de substrats connus ou universels, nous avons construit de nouvelles protéines par substitution/inversion de ces motifs et testé leur activité kinase. L'ensemble des observations que j'ai réalisées ne nous ont

malheureusement pas permis de confirmer les hypothèses émises à partir de l'analyse des structures cristallographiques. Cependant, nous proposons que le motif retrouvé en N-terminal des BY-kinases puisse être responsable de l'inactivité de CapB1. Une hypothèse intéressante concernant le rôle de cette extrémité flexible peut être formulée à partir des observations réalisées sur les structures des BY-kinases Wzc (Béchet *et al.*, 2010) et Etk (Lee *et al.*, 2008) d'*E. coli*. En effet, ces protéines possèdent une boucle flexible riche en résidus basiques, le « RK cluster », qui est essentielle pour la synthèse de l'exopolysaccharide. Il a aussi été proposé que cette région intervienne dans l'interaction entre les BY-kinases et les autres composants de la machinerie de synthèse du polysaccharide (Béchet *et al.*, 2010). La superposition des structures de CapA_{cyto}B et Wzc_{cyto} suggère par ailleurs que cette région N-terminale pourrait jouer le même rôle que le RK-cluster au sein du complexe multiprotéique. Ces interactions pourraient alors être essentielles pour l'activité de CapB1 et n'avoir qu'une faible importance pour celle de CapB2.

On ne peut pas non plus écarter l'hypothèse, certes provocante, que CapB1 puisse être réellement inactive *in vivo*. Ainsi, nous pouvons nous demander quel serait l'intérêt, pour *S. aureus*, de conserver un gène codant pour une protéine inactive. Une réponse possible serait liée à la duplication des gènes codant pour des BY-kinases dans différents génomes bactériens (Jadeau *et al.*, 2008). Ainsi, chez *B. subtilis*, une situation similaire est retrouvée avec la présence de deux BY-kinases. L'une, PtkA, est active alors que l'autre, PtkB ne l'est pas *in vitro* (Mijakovic *et al.*, 2003). On peut alors envisager que ces BY-kinases inactives interfèrent avec la fonction cellulaire de celles qui sont actives. A partir de cette hypothèse, un parallèle peut être fait avec les pseudokinases eucaryotes qui possèdent plusieurs motifs de protéine-kinases mais qui sont complètement inactives (Boudeau *et al.*, 2006). Il a d'ailleurs été proposé que ces protéines puissent agir comme un échafaudage moléculaire (Qin et Wu, 2012) ou comme un facteur allostérique (Jura *et al.*, 2009) afin de promouvoir l'activité des autres protéine-kinases. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que CapB1 puisse agir telle une pseudokinase et jouer un rôle important dans les processus cellulaires contrôlés par CapB2 tels que la synthèse et l'export des polysaccharides extracellulaires. Afin de répondre à l'ensemble de ces questions, des approches cellulaires sont aujourd'hui nécessaires. Ces approches nous permettraient en effet de mieux comprendre les mécanismes cellulaires mis en place et contrôlés par ces différentes protéines.

Dans la troisième partie de mon travail, j'ai participé à l'étude des interactions régulatrices entre la BY-kinase Wzc d'*E. coli* et sa phosphotyrosine-phosphatase de basse masse

moléculaire associée, Wzb. A partir de la structure du complexe formé par ces deux protéines, obtenue par résonance magnétique nucléaire, nous avons tout d'abord mis en évidence que Wzb interagissait avec Wzc au niveau d'une région n'incluant aucun motif catalytique de Wzc mais contenant le motif EX₂RX₂R hautement conservé et connu pour son rôle dans la formation de la structure octamérique des BY-kinases (Béchet *et al.*, 2010). Le rôle critique de ce motif dans l'interaction entre Wzb et Wzc a alors été contrôlé par des études d'interaction ainsi que des approches biochimiques révélant que des mutations au sein de ce motif affectaient la capacité de Wzb à déphosphoryler Wzc. Nos résultats montrent qu'au-delà de son rôle dans la déphosphorylation directe du cluster de tyrosines, Wzb pourrait également avoir un rôle annexe qui consisterait à contrôler la réassociation de l'octamère et la transphosphorylation des BY-kinases par compétition. Cette interaction pourrait alors permettre d'augmenter l'accessibilité de différents substrats tels qu'Ugd au site catalytique des BY-kinases (Grangeasse *et al.*, 2002). Notre étude a été réalisée à l'aide du domaine cytoplasmique de Wzc. Nous ne pouvons donc pas nous affranchir du fait qu'*in vivo* la conformation de ce domaine ainsi que les interactions avec Wzb puissent être également modulées par les domaines périplasmiques et transmembranaires de Wzc comme c'est le cas chez les eucaryotes avec les récepteurs à activité tyrosine-kinase (Arkhipov *et al.*, 2013 ; Endres *et al.*, 2013). De plus, cette interaction pourrait également être modulée par des modifications post-traductionnelles telle que la phosphorylation. Il a d'ailleurs été observé qu'Etp, la phosphotyrosine-phosphatase associée à la BY-kinase Etk, était phosphorylée par une kinase encore inconnue au niveau d'un résidu tyrosyle présent dans sa boucle D (Nadler *et al.*, 2012). Cependant, aucune expérience ne montre que la tyrosine équivalente chez Wzc est elle aussi phosphorylée.

Nos résultats ont aussi permis de montrer que, lors de l'interaction entre Wzb et Wzc, le site catalytique de Wzb était soumis à différents changements conformationnels. Ces modifications reflètent un effet allostérique de l'interaction Wzc/Wzb sur le site catalytique de Wzb. Wzb est également soumise à de nombreux changements conformationnels au niveau de ses boucles P et D en présence de phosphate. L'obtention récente de la première structure cristallographique d'une phosphatase en absence de phosphate (Stehle *et al.*, 2012) constitue une bonne base afin de comprendre le rôle de ces différentes modifications conformationnelles. En effet, lors de cette étude il a été montré que MptpA, la LMW-PTP de *M. tuberculosis* adopte une conformation « ouverte » en absence de phosphate dans laquelle la distance entre les boucles P et D est plus élevée qu'au sein de la conformation « fermée » (Madhurantakam *et al.*, 2005). Les

modifications conformationnelles observées au niveau de ces deux boucles lors de notre étude sont en accord avec cette observation. Nous pouvons également noter que les changements conformationnels observés au niveau de la boucle P sont en grande partie réduits en présence de phosphate. Ainsi, le groupement phosphate de la phosphotyrosine semble être important pour Wzb et la reconnaissance de ses substrats. Le résidu tyrosyle de la phosphotyrosine est quant à lui stabilisé par des interactions avec une autre tyrosine présente dans la boucle D de Wzb. Cette tyrosine, phosphorylée dans Etp, est fortement conservée au sein des LMW-PTP. Le rôle central du résidu tyrosyle dans la stabilisation du substrat est confirmé par la diminution drastique de l'activité phosphatase de Wzb lorsque ce résidu est muté en alanine. Au vu de l'ensemble de ces résultats, il semblerait que l'interaction entre Wzc et Wzb permette de rapprocher le cluster de tyrosines de Wzc du site catalytique de Wzb. La déphosphorylation par Wzb dépend alors de la concentration en résidus phosphorylés à proximité de son site catalytique. Cette étude donne les premières indications concernant l'interaction entre les BY-kinases et leurs phosphotyrosine-phosphatases associées. Elle représente ainsi une étape majeure dans la compréhension des mécanismes de régulation de la phosphorylation des BY-kinases par les LMW-PTPs.

Références bibliographiques

- Aarsman ME, Piette A, Fraipont C, Vinkenvleugel TM, Nguyen-Distèche M, den Blaauwen T (2005). Maturation of the *Escherichia coli* divisome occurs in two steps. *Mol. Microbiol.* **55** (6), 1631-1645.
- Allison DG, Matthews MJ (1992). Effect of polysaccharide interactions on antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Bacteriol.* **73** (6), 484-488.
- AlonsoDeVelasco E, Verheul AF, Verhoef J, Snippe H (1995). *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol. Rev.* **59** (4), 591-603. **Review.**
- Anderson DE, Gueiros-Filho FJ, Erickson HP (2004). Assembly dynamics of FtsZ rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and effects of FtsZ-regulating proteins. *J. Bacteriol.* **186** (17), 5775-5781.
- Arkipov A, Shan Y, Das R, Endres NF, Eastwood MP, Wemmer DE, Kuriyan J, Shaw DE (2013). Architecture and membrane interactions of the EGF receptor. *Cell.* **152** (3), 557-569.
- Aussel L, Barre FX, Aroyo M, Stasiak A, Stasiak AZ, 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** (2), 195-205.
- Austin S, Abeles A (1983). Partition of unit-copy miniplasmids to daughter cells. II. The partition region of miniplasmid P1 encodes an essential protein and a centromere-like site at which it acts. *J. Mol. Biol.* **169** (2), 373-387.
- Bach H, Wong D, Av-Gay Y (2009). *Mycobacterium tuberculosis* PtkA is a novel protein tyrosine kinase whose substrate is PtpA. *Biochem. J.* **420** (2), 155-160.
- Barák I, Wilkinson AJ (2007). Division site recognition in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **31** (3), 311-326.
- Barendt SM, Land AD, Sham LT, Ng WL, Tsui HC, Arnold RJ, Winkler ME (2009). Influences of capsule on cell shape and chain formation of wild-type and *pcsB* mutants of serotype 2 *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **191** (9), 3024-3040.
- Barendt SM, Sham LT, Winkler ME (2011). Characterization of mutants deficient in the L,D-carboxypeptidase (DacB) and WalRK (VicRK) regulon, involved in peptidoglycan maturation of *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 strain D39. *J. Bacteriol.* **193** (9), 2290-2300.
- Barker S, Matthews R, Lee W, Bostock A, Burnie J (1991). Identification of a gene encoding an HPr-like protein in *Aspergillus fumigatus*. *J. Med. Vet. Mycol.* **29** (6), 381-386.
- Béchet E, Guiral S, Torres S, Mijakovic I, Cozzone AJ, Grangeasse C (2009). Tyrosine-kinases in bacteria: from a matter of controversy to the status of key regulator enzymes. *Amino Acids.* **37** (3), 499-507. **Review.**
- Béchet E, Gruszczuk J, Terreux R, Gueguen-Chaignon V, Vigouroux A, Obadia B, Cozzone AJ, Nessler S, Grangeasse C (2010). Identification of structural and molecular determinants of the tyrosine-kinase Wzc and implications in capsular polysaccharide export. *Mol. Microbiol.* **77** (5), 1315-1325.
- Becker A, Pühler A (1998). Specific amino acid substitutions in the proline-rich motif of the *Rhizobium meliloti* ExoP protein result in enhanced production of low-molecular-weight succinoglycan at the expense of high-molecular-weight succinoglycan. *J. Bacteriol.* **180** (2), 395-399.
- Beilharz K, Nováková L, Fadda D, Branny P, Massidda O, Veening JW (2012). Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109** (15), E905-913.
- Bender MH, Cartee RT, Yother J (2003). Positive correlation between tyrosine phosphorylation of CpsD and capsular polysaccharide production in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **185** (20), 6057-6066.
- Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, Saunders D, Rabinowitsch E, Collins M, Donohoe K, Harris D, Murphy L, Quail MA, Samuel G, Skovsted IC, Kalltoft MS, Barrell B, Reeves PR, Parkhill J, Spratt BG (2006). Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet.* **2** (3), e31.

- Ben-Yehuda S, Rudner DZ, Losick R (2003). RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to the cell poles. *Science*. **299** (5606), 532-536.
- Bernhardt TG, de Boer PA (2005). SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Mol. Cell*. **18** (5), 555-564.
- Bischoff DS, Ordal GW (1991). Sequence and characterization of *Bacillus subtilis* CheB, a homolog of *Escherichia coli* CheY, and its role in a different mechanism of chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **266** (19), 12301-12305.
- Bliska JB (2000). Yop effectors of *Yersinia spp.* and actin rearrangements. *Trends Microbiol.* **8** (5), 205-208. **Review**.
- Bliss JM, Silver RP (1997). Evidence that KpsT, the ATP-binding component of an ATP-binding cassette transporter, is exposed to the periplasm and associates with polymer during translocation of the polysialic acid capsule of *Escherichia coli* K1. *J. Bacteriol.* **179** (4), 1400-1403.
- Boudeau J, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Alessi DR (2006). Emerging roles of pseudokinases. *Trends Cell Biol.* **16** (9), 443-452. **Review**.
- Bourret RB, Hess JF, Borkovich KA, Pakula AA, Simon MI (1989). Protein phosphorylation in chemotaxis and two-component regulatory systems of bacteria. *J. Biol. Chem.* **264**, 7085-7088.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bramkamp M, Emmins R, Weston L, Donovan C, Daniel RA, Errington J (2008). A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. *Mol. Microbiol.* **70** (6), 1556-1569.
- Branda SS, Gonzalez-Pastor JE, Ben-Yehuda S, Losick R, Kolter R (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 11621-11626.
- Breier AM, Grossman AD (2007). Whole-genome analysis of the chromosome partitioning and sporulation protein Spo0J (ParB) reveals spreading and origin-distal sites on the *Bacillus subtilis* chromosome. *Mol. Microbiol.* **64** (3), 703-718.
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM (1987). XLI-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques.* **5**, 376-379.
- Burbulys D, Trach KA, Hoch JA (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell.* **64** (3), 545-552.
- Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Albertí S, Bengoechea JA (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* **72** (12), 7107-7114.
- Castandet J, Prost JF, Peyron P, Astarie-Dequeker C, Anes E, Cozzone AJ, Griffiths G, Maridonneau-Parini I (2005). Tyrosine phosphatase MptpA of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits phagocytosis and increases actin polymerization in macrophages. *Res. Microbiol.* **156** (10), 1005-1013.
- Chang C, Meyerowitz EM (1995). The ethylene hormone response in *Arabidopsis*: a eukaryotic two-component signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92** (10), 4129-4133.
- Chewapreecha C, Harris SR, Croucher NJ, Turner C, Marttinen P, Cheng L, Pessia A, Aanensen DM, Mather AE, Page AJ, Salter SJ, Harris D, Nosten F, Goldblatt D, Corander J, Parkhill J, Turner P, Bentley SD (2014). Dense genomic sampling identifies highways of pneumococcal recombination. *Nat. Genet.* **46** (3), 305-309.
- Cho H, McManus HR, Dove SL, Bernhardt TG (2011). Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108** (9), 3773-3778.

- Claessen D, Emmins R, Hamoen LW, Daniel RA, Errington J, Edwards DH (2008). Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **68** (4), 1029-1046.
- Collins RF, Beis K, Clarke BR, Ford RC, Hulley M, Naismith JH, Whitfield (2006). Periplasmic protein-protein contacts in the inner membrane protein Wzc form a tetrameric complex required for the assembly of *Escherichia coli* group I capsules. *J. Biol. Chem.* **281**, 2144-2150.
- Collins RF, Beis K, Dong C, Botting CH, McDonnell C, Ford RC, Clarke BR, Whitfield C, Naismith JH (2007). The 3D structure of a periplasm-spanning platform required for assembly of group I capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 2390-2395.
- Correa NE, Peng F, Klose KE (2005). Roles of the regulatory proteins FlhF and FlhG in the *Vibrio cholerae* flagellar transcription hierarchy. *J. Bacteriol.* **187** (18), 6324-6332.
- Cortay JC, Rieul C, Duclos B, Cozzone AJ (1986). Characterization of the phosphoproteins of *Escherichia coli* cells by electrophoretic analysis. *Eur. J. Biochem.* **159**, 227-237.
- Costerton JW, Irvin RT, Cheng KJ (1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**, 299-324. **Review.**
- Cozzone AJ (1988). Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**, 97-125. **Review.**
- Cozzone AJ (1997). Diversity and specificity of protein-phosphorylating systems in bacteria. *Folia Microbiol.* **42** (3), 165-170. **Review.**
- Cuthbertson L, Mainprize IL, Naismith JH, Whitfield C (2009). Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73** (1), 155-177. **Review.**
- de Pedro MA, Donachie WD, Höltje JV, 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** (14), 4115-4126.
- Derouiche A, Bidnenko V, Grenha R, Pignonneau N, Ventroux M, Franz-Wachtel M, Nessler S, Noirot-Gros MF, Mijakovic I (2013). Interaction of bacterial fatty-acid-displaced regulators with DNA is interrupted by tyrosine phosphorylation in the helix-turn-helix domain. *Nucleic Acids Res.* **41** (20), 9371-9381.
- Deutscher J, Saier MH Jr (2005). Ser/Thr/Tyr protein phosphorylation in bacteria - for long time neglected, now well established. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **9** (3-4), 125-131. **Review.**
- Deutscher J, Francke C, Postma PW (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70** (4), 939-1031. **Review.**
- Dodgson C, Amor P, Whitfield C (1996). Distribution of the *rol* gene encoding the regulator of lipopolysaccharide O-chain length in *Escherichia coli* and its influence on the expression of group I capsular K antigens. *J. Bacteriol.* **178** (7), 1895-1902.
- Doublet P, Vincent C, Grangeasse C, Cozzone AJ, Duclos B (1999). On the binding of ATP to the autophosphorylating protein, Ptk, of the bacterium *Acinetobacter johnsonii*. *FEBS Lett.* **445** (1), 137-143.
- Draper GC, McLennan N, Begg K, Masters M, Donachie WD (1998). Only the N-terminal domain of FtsK functions in cell division. *J. Bacteriol.* **180** (17), 4621-4627.
- Duclos B, Grangeasse C, Vaganay E, Riberty M, Cozzone AJ (1996). Autophosphorylation of a bacterial protein at tyrosine. *J. Mol. Biol.* **259** (5), 891-895.

- Dudman WF (1964). Growth and extracellular polysaccharide production by *Rhizobium meliloti* in defined medium. *J. Bacteriol.* **88**, 640-645.
- Easter J Jr, Gober JW (2002). ParB-stimulated nucleotide exchange regulates a switch in functionally distinct ParA activities. *Mol. Cell.* **10** (2), 427-434.
- Eberhardt A, Hoyland CN, Vollmer D, Bisle S, Cleverley RM, Johnsborg O, Håvarstein LS, Lewis RJ, Vollmer W (2012). Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* **18** (3), 240-255.
- Ebersbach G, Gerdes K (2005). Plasmid segregation mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 453-479. **Review.**
- Ehlert K, Höltje JV (1996). Role of precursor translocation in coordination of murein and phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178** (23), 6766-6771.
- Endres NF, Das R, Smith AW, Arkhipov A, Kovacs E, Huang Y, Pelton JG, Shan Y, Shaw DE, Wemmer DE, Groves JT, Kuriyan J (2013). Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the EGF receptor. *Cell.* **152** (3), 543-556.
- Erickson HP, Anderson DE, Osawa M (2010). FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev.* **74** (4), 504-528. **Review.**
- Eswaramoorthy P, Erb ML, Gregory JA, Silverman J, Pogliano K, Pogliano J, Ramamurthi KS (2011). Cellular architecture mediates DivIVA ultrastructure and regulates min activity in *Bacillus subtilis*. *MBio.* **2** (6), e00257-11.
- Evans BA, Rozen DE (2012). A *Streptococcus pneumoniae* infection model in larvae of the wax moth *Galleria mellonella*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31** (10), 2653-2660.
- Fadda D, Pischedda C, Caldara F, Whalen MB, Anderluzzi D, Domenici E, Massidda O (2003). Characterization of *divIVA* and other genes located in the chromosomal region downstream of the *dcw* cluster in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **185** (20), 6209-6214.
- Fadda D, Santona A, D'Ulisse V, Ghelardini P, Ennas MG, Whalen MB, Massidda O (2007). *Streptococcus pneumoniae* DivIVA: localization and interactions in a MinCD-free context. *J. Bacteriol.* **189** (4), 1288-1298.
- Fiche JB, Cattoni DI, Diekmann N, Langerak JM, Clerte C, Royer CA, Margeat E, Doan T, Nöllmann M (2013). Recruitment, assembly, and molecular architecture of the SpoIIIE DNA pump revealed by superresolution microscopy. *PLoS Biol.* **11** (5), e1001557.
- Finke A, Bronner D, Nikolaev AV, Jann B, Jann K (1991). Biosynthesis of the *Escherichia coli* K5 polysaccharide, a representative of group II capsular polysaccharides: polymerization *in vitro* and characterization of the product. *J. Bacteriol.* **173** (13), 4088-4094.
- Fleurie A, Cluzel C, Guiral S, Freton C, Galisson F, Zanella-Cleon I, Di Guilmi AM, Grangeasse C (2012). Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **83** (4), 746-758.
- Fleurie A, Manuse S, Zhao C, Campo N, Cluzel C, Lavergne JP, Freton C, Combet C, Guiral S, Soufi B, Macek B, Kuru E, VanNieuwenhze MS, Brun YV, Di Guilmi AM, Claverys JP, Galinier A, Grangeasse C (2014a). Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. *PLoS Genet.* **10** (4), e1004275.
- Fleurie A, Lesterlin C, Manuse S, Zhao C, Cluzel C, Lavergne JP, Franz-Wachtel M, Macek B, Combet C, Kuru E, VanNieuwenhze MS, Brun YV, Sherratt D, Grangeasse C (2014b). MapZ beacons the division sites and positions FtsZ-rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature*. In press.
- Fraipont C, Alexeeva S, Wolf B, van der Ploeg R, Schloesser M, den Blaauwen T, Nguyen-Distèche M (2011). The integral membrane FtsW protein and peptidoglycan synthase PBP3 form a subcomplex in *Escherichia coli*. *Microbiology.* **157** (Pt 1), 251-259.

- Fuhrmann J, Schmidt A, Spiess S, Lehner A, Turgay K, Mechtler K, Charpentier E, Clausen T (2009). McsB is a protein arginine kinase that phosphorylates and inhibits the heat-shock regulator CtsR. *Science*. **324** (5932), 1323-1327.
- Garnak M, Reeves HC (1979). Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science*. **203**, 1111-1112.
- Garti-Levi S, Hazan R, Kain J, Fujita M, Ben-Yehuda S (2008). The FtsEX ABC transporter directs cellular differentiation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **69** (4), 1018-1028.
- Ge R, Sun X, Xiao C, Yin X, Shan W, Chen Z, He QY (2011). Phosphoproteome analysis of the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori* reveals over-representation of tyrosine phosphorylation and multiply phosphorylated proteins. *Proteomics*. **11** (8), 1449-1461.
- Geno KA, Hauser JR, Gupta K, Yother J (2014). *Streptococcus pneumoniae* phosphotyrosine phosphatase CpsB and alterations in capsule production resulting from changes in oxygen availability. *J. Bacteriol.* **196** (11), 1992-2003.
- Ghuysen JM, Goffin C (1999). Lack of cell wall peptidoglycan versus penicillin sensitivity: new insights into the chlamydial anomaly. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43** (10), 2339-2344. **Review.**
- Ginda K, Bezulska M, Ziółkiewicz M, Dziadek J, Zakrzewska-Czerwińska J, Jakimowicz D (2013). ParA of *Mycobacterium smegmatis* co-ordinates chromosome segregation with the cell cycle and interacts with the polar growth determinant DivIVA. *Mol. Microbiol.* **87** (5), 998-1012.
- Grangeasse C, Doublet P, Vaganay E, Vincent C, Deléage G, Duclos B, Cozzone AJ (1997). Characterization of a bacterial gene encoding an autophosphorylating protein tyrosine kinase. *Gene*. **204**, 259-265.
- Grangeasse C, Doublet P, Cozzone AJ (2002). Tyrosine phosphorylation of protein kinase Wzc from *Escherichia coli* K12 occurs through a two-step process. *J. Biol. Chem.* **277**, 7127-7135.
- Grangeasse C, Obadia B, Mijakovic I, Deutscher J, Cozzone AJ, Doublet P (2003). Autophosphorylation of the *Escherichia coli* protein kinase Wzc regulates tyrosine phosphorylation of Ugd, a UDP-glucose dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **278**, 39323-39329.
- Grangeasse C, Cozzone AJ, Deutscher J, Mijakovic I (2007). Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 86-94. **Review.**
- Grangeasse C, Terreux R, Nessler S (2010). Bacterial tyrosine-kinases: Structure–function analysis and therapeutic potential. *Bioch. Bioph. Acta.* **1804**, 628–634. **Review.**
- Gregory JA, Becker EC, Pogliano K (2008). *Bacillus subtilis* MinC destabilizes FtsZ-rings at new cell poles and contributes to the timing of cell division. *Genes Dev.* **22** (24), 3475-3488.
- Gruszczuk J, Fleurie A, Olivares-Illana V, Béchet E, Zanella-Cleon I, Moréra S, Meyer P, Pompidor G, Kahn R, Grangeasse C, Nessler S (2011). Structure analysis of the *Staphylococcus aureus* UDP-N-acetyl-mannosamine dehydrogenase Cap5O involved in capsular polysaccharide biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **286** (19), 17112-17121.
- Guidolin A, Morona JK, Morona R, Hansman D, Paton JC (1994). Nucleotide sequence analysis of genes essential for capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 19F. *Infect. Immun.* **62** (12), 5384-5396.
- Gündoğdu ME, Kawai Y, Pavlendova N, Ogasawara N, Errington J, Scheffers DJ, Hamoen LW (2011). Large ring polymers align FtsZ polymers for normal septum formation. *EMBO J.* **30** (3), 617-626.
- Haeusser DP, Schwartz RL, Smith AM, Oates ME, Levin PA (2004). EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. *Mol. Microbiol.* **52** (3), 801-814.
- Halbedel S, Hahn B, Daniel RA, Flieger A (2012). DivIVA affects secretion of virulence-related autolysins in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **83** (4), 821-839.

- Hamoen LW, Meile JC, de Jong W, Noirot P, Errington J (2006). SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. *Mol. Microbiol.* **59** (3), 989-999.
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science.* **241** (4861), 42-52. **Review.**
- Harry E, Monahan L, Thompson L (2006). Bacterial cell division: the mechanism and its precision. *Int. Rev. Cytol.* **253**, 27-94.
- Hartmann MD, Bourenkov GP, Oberschall A, Strizhov N, Bartunik HD (2006). Mechanism of phosphoryl transfer catalyzed by shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mol. Biol.* **364**, 411-423.
- Henriques MX, Rodrigues T, Carido M, Ferreira L, Filipe SR (2011). Synthesis of capsular polysaccharide at the division septum of *Streptococcus pneumoniae* is dependent on a bacterial tyrosine kinase. *Mol. Microbiol.* **82** (2), 515-534.
- Hester CM, Lutkenhaus J (2007). Soj (ParA) DNA binding is mediated by conserved arginines and is essential for plasmid segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104** (51), 20326-20331.
- Hofmann K, Stoffel W (1993). TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**, 166.
- Howard M, Kruse K (2005). Cellular organization by self-organization: mechanisms and models for Min protein dynamics. *J. Cell. Biol.* **168** (4), 533-536. **Review.**
- Hu Z, Lutkenhaus J (2000). Analysis of MinC reveals two independent domains involved in interaction with MinD and FtsZ. *J. Bacteriol.* **182** (14), 3965-3971.
- Ireton K, Gunther NW 4th, Grossman AD (1994). *spo0J* is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176** (17), 5320-5329.
- Ishikawa S, Kawai Y, Hiramatsu K, Kuwano M, Ogasawara N (2006). A new FtsZ-interacting protein, YlmF, complements the activity of FtsA during progression of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **60** (6), 1364-1380.
- Jadeau F, Béchet E, Cozzone AJ, Deléage G, Grangeasse C, Combet C (2008). Identification of the idiosyncratic bacterial protein-tyrosine kinase (BY-kinase) family signature. *Bioinformatics.* **21**, 2427-2430.
- Jadeau F, Grangeasse C, Shi L, Mijakovic I, Deléage G, Combet C (2012). BYKdb: the Bacterial protein tYrosine Kinase database. *Nucleic Acids Res.* **40** (Database issue), D321-4.
- James DB, Gupta K, Hauser JR, Yother J (2013). Biochemical activities of *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 capsular glycosyltransferases and significance of suppressor mutations affecting the initiating glycosyltransferase Cps2E. *J. Bacteriol.* **195** (24), 5469-5478.
- James P, Halladay J, Craig EA (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics.* **144**, 1425-1436.
- Jensen RB, Shapiro L (1999). The *Caulobacter crescentus smc* gene is required for cell cycle progression and chromosome segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96** (19), 10661-10666.
- Jensen SO, Thompson LS, Harry EJ (2005). Cell division in *Bacillus subtilis*: FtsZ and FtsA association is Z-ring independent, and FtsA is required for efficient midcell Z-Ring assembly. *J. Bacteriol.* **187** (18), 6536-6544.
- Jers C, Pedersen MM, Paspaliari DK, Schütz W, Johnsson C, Jensen PR, Mijakovic I (2010). *Bacillus subtilis* BY-kinase PtkA controls enzyme activity and localization of its protein substrates. *Mol. Microbiol.* **77** (2), 287-299.
- Jura N, Shan Y, Cao X, Shaw DE, Kuriyan J (2009). Structural analysis of the catalytically inactive kinase domain of the human EGF receptor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106** (51), 21608-21613.

- Kawai Y, Marles-Wright J, Cleverley RM, Emmins R, Ishikawa S, Kuwano M, Heinz N, Bui NK, Hoyland CN, Ogasawara N, Lewis RJ, Vollmer W, Daniel RA, Errington J (2011). A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins. *EMBO J.* **30** (24), 4931-4941.
- Kennelly PJ (2002). Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**, 1-8. **Review.**
- Kennelly PJ, Potts M (1999). Life among the primitives: protein O-phosphatases in prokaryotes. *Front. Biosci.* **4**, D372-385. **Review.**
- Kiekebusch D, Michie KA, Essen LO, Löwe J, Thanbichler M (2012). Localized dimerization and nucleoid binding drive gradient formation by the bacterial cell division inhibitor MipZ. *Mol. Cell.* **46** (3), 245-259.
- Kiley TB, Stanley-Wall NR (2010). Post-translational control of *Bacillus subtilis* biofilm formation mediated by tyrosine phosphorylation. *Mol. Microbiol.* **78** (4), 947-963.
- Klein G, Dartigalongue C, Raina S (2003). Phosphorylation-mediated regulation of heat shock response in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **48**, 269-285.
- Kolot M, Gorovits R, Silberstein N, Fichtman B, Yagil E (2008). Phosphorylation of the integrase protein of coliphage HK022. *Virology.* **375**, 383-390.
- Kobir A, Shi L, Boskovic A, Grangeasse C, Franjevic D, Mijakovic I (2011). Protein phosphorylation in bacterial signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta.* **1810** (10), 989-994.
- Kusebauch U, Ortega C, Ollodart A, Rogers RS, Sherman DR, Moritz RL, Grundner C (2014). *Mycobacterium tuberculosis* supports protein tyrosine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111** (25), 9265-9270.
- Lackner LL, Raskin DM, de Boer PA (2003). ATP-dependent interactions between *Escherichia coli* Min proteins and the phospholipid membrane *in vitro*. *J. Bacteriol.* **185** (3), 735-749.
- Lacour S, Béchet E, Cozzone AJ, Mijakovic I, Grangeasse C (2008). Tyrosine phosphorylation of the UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance. *PLoS One.* **3** (8), e3053.
- Lara B, Rico AI, Petruzzelli S, Santona A, Dumas J, Biton J, Vicente M, Mingorance J, Massidda O (2005). Cell division in cocci: localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein. *Mol. Microbiol.* **55** (3), 699-711.
- Le Bourgeois P, Bugarel M, Campo N, Daveran-Mingot ML, Labonté J, Lanfranchi D, Lautier T, Pagès C, Ritzenthaler P (2007). The unconventional Xer recombination machinery of Streptococci/Lactococci. *PLoS Genet.* **3** (7), e117.
- Lee DC, Zheng J, She YM, Jia Z (2008). Structure of *Escherichia coli* tyrosine-kinase Etk reveals a novel activation mechanism. *EMBO J.* **27**, 1758-1766.
- Lee PS, Grossman AD (2006). The chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) contribute to accurate chromosome partitioning, separation of replicated sister origins, and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **60** (4), 853-869.
- Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPase. *J. Mol. Biol.* **317**, 41-72.
- Leonard TA, Butler PJ, Löwe J (2005). Bacterial chromosome segregation: structure and DNA binding of the Soj dimer--a conserved biological switch. *EMBO J.* **24** (2), 270-282.
- Leroux B, Yanofsky MF, Winans SC, Ward JE, Ziegler SF, Nester EW (1987). Characterization of the *virA* locus of *Agrobacterium tumefaciens*: a transcriptional regulator and host range determinant. *EMBO J.* **6** (4), 849-856.

- Letek M, Ordóñez E, Vaquera J, Margolin W, Flårdh K, Mateos LM, Gil JA (2008). DivIVA is required for polar growth in the MreB-lacking rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **190** (9), 3283-3292.
- Levin PA, Kurtser IG, Grossman AD (1999). Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96** (17), 9642-9647.
- Li Z, Trimble MJ, Brun YV, Jensen GJ (2007). The structure of FtsZ filaments in vivo suggests a force-generating role in cell division. *EMBO J.* **26** (22), 4694-4708.
- Lim HC, Surovtsev IV, Beltran BG, Huang F, Bewersdorf J, Jacobs-Wagner C (2014). Evidence for a DNA-relay mechanism in ParABS-mediated chromosome segregation. *Elife.* **3**, e02758.
- Lin DC, Levin PA, Grossman AD (1997). Bipolar localization of a chromosome partition protein in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94** (9), 4721-4726.
- Lin DC, Grossman AD (1998). Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. *Cell.* **92** (5), 675-685.
- Lin MH, Hsu TL, Lin SY, Pan YJ, Jan JT, Wang JT, Khoo KH, Wu SH (2009). Phosphoproteomics of *Klebsiella pneumoniae* NTHU-K2044 reveals a tight link between tyrosine phosphorylation and virulence. *Mol. Cell. Proteomics.* **8**, 2613-2623.
- Lindås AC, Bernander R (2013). The cell cycle of archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **11** (9), 627-638. **Review.**
- Liu G, Draper GC, Donachie WD (1998). FtsK is a bifunctional protein involved in cell division and chromosome localization in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **29** (3), 893-903.
- Livny J, Yamaichi Y, Waldor MK (2007). Distribution of centromere-like *parS* sites in bacteria: insights from comparative genomics. *J. Bacteriol.* **189** (23), 8693-8703.
- Lu C, Reedy M, Erickson HP (2000). Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J. Bacteriol.* **182** (1), 164-170.
- Lu T, Tan H, Lee D, Chen G, Jia Z (2009). New insights into the activation of *Escherichia coli* tyrosine kinase revealed by molecular dynamics simulation and biochemical analysis. *Biochemistry.* **48**, 7986-7995.
- Lutkenhaus J (2007). Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 539-562. **Review.**
- Lutkenhaus J (2012). The ParA/MinD family puts things in their place. *Trends Microbiol.* **20** (9), 411-418. **Review.**
- Lutkenhaus J, Pichoff S, Du S (2012). Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome. *Cytoskeleton (Hoboken).* **69** (10), 778-790. **Review.**
- Macek B, Mijakovic I, Olsen JV, Gnad F, Kumar C, Jensen PR, Mann M (2007). The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol. Cell. Proteomics.* **6**, 697-707.
- Macek B, Gnad F, Soufi B, Kumar C, Olsen JV, Mijakovic I, Mann M (2008). Phosphoproteome analysis of *E. coli* reveals evolutionary conservation of bacterial Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental process. *Mol. Microbiol.* **46**, 571-586.
- Madhurantakam C, Rajakumara E, Mazumdar PA, Saha B, Mitra D, Wiker HG, Sankaranarayanan R, Das AK (2005). Crystal structure of low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.9-Å resolution. *J. Bacteriol.* **187** (6), 2175-2181.
- Magasanik B (1988). Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of bacterial nitrogen utilization genes. *Trends Biochem. Sci.* **13** (12), 475-479. **Review.**

- Mainprize IL, Bean JD, Bouwman C, Kimber MS, Whitfield C (2013). The UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12 displays substrate inhibition by NAD that is relieved by nucleotide triphosphates. *J. Biol. Chem.* **288** (32), 23064-23074.
- Manai M, Cozzone AJ (1979). Analysis of the protein-kinase activity of *Escherichia coli* cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 819-826.
- Manat G, Roure S, Auger R, Bouhss A, Barreteau H, Mengin-Lecreux D, Touzé T (2014). Deciphering the metabolism of undecaprenyl-phosphate: the bacterial cell-wall unit carrier at the membrane frontier. *Microb. Drug Resist.* **20** (3), 199-214.
- Margolin W (2000). Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol Rev.* **24** (4), 531-548. **Review.**
- Margolin W (2006). Bacterial division: another way to box in the ring. *Curr. Biol.* **16** (20), R881-884.
- Marston AL, Errington J (1999). Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. *Mol. Microbiol.* **33** (1), 84-96.
- Martin B, Prudhomme M, Alloing G, Granadel C, Claverys JP (2000). Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **38** (4), 867-878.
- Massey TH, Mercogliano CP, Yates J, Sherratt DJ, Löwe J (2006). Double-stranded DNA translocation: structure and mechanism of hexameric FtsK. *Mol. Cell.* **23** (4), 457-469.
- Mattoo AR, Arora A, Maiti S, Singh Y (2008). Identification, characterization and activation mechanism of a tyrosine kinase of *Bacillus anthracis*. *FEBS J.* **275** (24), 6237-6247.
- Mijakovic I, Poncet S, Boël G, Mazé A, Gillet S, Jamet E, Decottignies P, Grangeasse C, Doublet P, Le Maréchal P, Deutscher J (2003). Transmembrane modulator-dependent bacterial tyrosine kinase activates UDP-glucose dehydrogenases. *EMBO J.* **22**, 4709-4718.
- Mijakovic I, Musumeci L, Tautz L, Petranovic D, Edwards RA, Jensen PR, Mustelin T, Deutscher J, Bottini N (2005a). *In vitro* characterization of the *Bacillus subtilis* protein tyrosine phosphatase YwqE. *J. Bacteriol.* **187** (10), 3384-3390.
- Mijakovic I, Petranovic D, Bottini N, Deutscher J, Jensen PR (2005b). Protein-tyrosine phosphorylation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 189-197. **Review.**
- Mijakovic I, Petranovic D, Macek B, Cepo T, Mann M, Davies J, Jensen PR, Vujaklija D (2006). Bacterial single-strand DNA-binding proteins are phosphorylated on tyrosine. *Nucleic Acids Res.* **34**, 1588-1596.
- Mingorance J, Tadros M, Vicente M, González JM, Rivas G, Vélez M (2005). Visualization of single *Escherichia coli* FtsZ filament dynamics with atomic force microscopy. *J. Biol. Chem.* **280** (21), 20909-20914.
- Minic Z, Marie C, Delorme C, Faurie JM, Mercier G, Ehrlich D, Renault P (2007). Control of EpsE, the phosphoglycosyltransferase initiating exopolysaccharides synthesis in *Streptococcus thermophilus*, by EpsD tyrosine kinase. *J. Bacteriol.* **189** (4), 1351-1357.
- Minnen A, Attaiech L, Thon M, Gruber S, Veening JW (2011). SMC is recruited to oriC by ParB and promotes chromosome segregation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **81** (3), 676-688.
- Misra SK, Milohanic E, Aké F, Mijakovic I, Deutscher J, Monnet V, Henry C (2011). Analysis of the serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes* reveals phosphorylated proteins related to virulence. *Proteomics.* **11** (21), 4155-4165.
- Mohl DA, Guber JW (1997). Cell cycle-dependent polar localization of chromosome partitioning proteins in *Caulobacter crescentus*. *Cell.* **88** (5), 675-684.
- Molle V, Leiba J, Zanella-Cléon I, Becchi M, Kremer L (2010). An improved method to unravel phosphoacceptors in Ser/Thr protein kinase-phosphorylated substrates. *Proteomics.* **10** (21), 3910-3915.

- Morona JK, Paton JC, Miller DC, Morona R (2000a). Tyrosine phosphorylation of CpsD negatively regulates capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **35** (6), 1431-1442.
- Morona R, Van Den Bosch L, Daniels C (2000b). Evaluation of Wzz/MPA1/MPA2 proteins based on the presence of coiled-coil regions. *Microbiology.* **146** (Pt 1), 1-4.
- Morona JK, Morona R, Miller DC, Paton JC (2002). *Streptococcus pneumoniae* capsule biosynthesis protein CpsB is a novel manganese-dependent phosphotyrosine-protein phosphatase. *J. Bacteriol.* **184** (2), 577-583.
- Morona JK, Miller DC, Morona R, Paton JC (2004). The effect that mutations in the conserved capsular polysaccharide biosynthesis genes CpsA, CpsB and CpsD have on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **189**, 1905-1913.
- Morona JK, Morona R, Paton JC (2006). Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* type 2 is required for invasive disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103** (22), 8505-8510.
- Morona R, Purins L, Tocilj A, Matte A, Cygler M (2009). Sequence-structure relationships in polysaccharide co-polymerase (PCP) proteins. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 78-84.
- Mulder E, Woldringh CL (1989). Actively replicating nucleoids influence positioning of division sites in *Escherichia coli* filaments forming cells lacking DNA. *J. Bacteriol.* **171** (8), 4303-4314.
- Muñoz-Dorado J, Inouye S, Inouye M (1991). A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell.* **67**, 995-1006.
- Murray H, Ferreira H, Errington J (2006). The bacterial chromosome segregation protein Spo0J spreads along DNA from *parS* nucleation sites. *Mol. Microbiol.* **61** (5), 1352-1361.
- Murray H, Errington J (2008). Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by Soj/ParA. *Cell.* **135** (1), 74-84.
- Nadler C, Koby S, Peleg A, Johnson AC, Suddala KC, Sathiyamoorthy K, Smith BE, Saper MA, Rosenshine I (2012). Cycling of Etk and Etp phosphorylation states is involved in formation of group 4 capsule by *Escherichia coli*. *PLoS One.* **7** (6), e37984.
- Nakar D, Gutnick DL (2003). Involvement of a protein tyrosine kinase in production of the polymeric bioemulsifier emulsan from the oil-degrading strain *Acinetobacter lwoffii* RAG-1. *J. Bacteriol.* **185**, 1001-1009.
- Niemeyer D, Becker A (2001). The molecular weight distribution of succinoglycan produced by *Sinorhizobium meliloti* is influenced by specific tyrosine phosphorylation and ATPase activity of the cytoplasmic domain of the ExoP protein. *J. Bacteriol.* **183**, 5163-5170.
- Obadia B, Lacour S, Doublet P, Baubichon-Cortay H, Cozzone AJ, Grangeasse C (2007). Influence of tyrosine-kinase Wzc activity on colanic acid production in *Escherichia coli* K12 cells. *J. Mol. Biol.* **367**, 42-53.
- Ohlsen K, Donat S (2010). The impact of serine/threonine phosphorylation in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **300** (2-3), 137-141. **Review.**
- Olivares-Illana V, Meyer P, Béchet E, Gueguen-Chaignon V, Soulat D, Lazereg-Riquier S, Mijakovic I, Deutscher J, Cozzone AJ, Laprevote O, Morera S, Grangeasse C, Nessler S (2008). Structural basis for the regulation mechanism of the tyrosine kinase CapB from *Staphylococcus aureus*. *PLoS. Biol.* **6**, e143.
- Ota IM, Varshavsky A (1993). A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science.* **262** (5133), 566-569.
- Paiment A, Hocking J, Whitfield C (2002). Impact of phosphorylation of specific residues in the tyrosine autokinase, Wzc, on its activity in assembly of group 1 capsules in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184** (23), 6437-6447.
- Park KT, Wu W, Battaile KP, Lovell S, Holyoak T, Lutkenhaus J (2011). The Min oscillator uses MinD-dependent conformational changes in MinE to spatially regulate cytokinesis. *Cell.* **146** (3), 396-407.

- Parker JL, Jones AM, Serazetdinova L, Saalbach G, Bibb MJ, Naldrett MJ (2010). Analysis of the phosphoproteome of the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor* A3(2) by protein/peptide fractionation, phosphopeptide enrichment and high-accuracy mass spectrometry. *Proteomics*. **10** (13), 2486-2497.
- Patel S, Weaver KE (2006). Addiction toxin Fst has unique effects on chromosome segregation and cell division in *Enterococcus faecalis* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **188** (15), 5374-5384.
- Patrick JE, Kearns DB (2008). MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **70** (5), 1166-1179.
- Peleg A, Shifrin Y, Ilan O, Nadler-Yona C, Nov S, Koby S, Baruch K, Altuvia S, Elgrably-Weiss M, Abe CM, Knutton S, Saper MA, Rosenshine I (2005). Identification of an *Escherichia coli* operon required for formation of the O-antigen capsule. *J. Bacteriol.* **187**, 5259-5266.
- Petranovic D, Michelsen O, Zahradka K, Silva C, Petranovic M, Jensen PR, Mijakovic I (2007). *Bacillus subtilis* strain deficient for the protein tyrosine kinase PtkA exhibits impaired DNA replication. *Mol. Microbiol.* **63**, 1797-1805.
- Pichoff S, Lutkenhaus J (2005). Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol. Microbiol.* **55** (6), 1722-1734.
- Pinho MG, Kjos M, Veening JW (2013). How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **11** (9), 601-614. **Review**.
- Ptacin JL, Lee SF, Garner EC, Toro E, Eckart M, Comolli LR, Moerner WE, Shapiro L (2010). A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation. *Nat. Cell. Biol.* **12** (8), 791-798.
- Qin J, Wu C (2012). ILK: a pseudokinase in the center stage of cell-matrix adhesion and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24** (5), 607-613.
- Ramponi G, Stefani M (1997). Structure and function of the low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1341** (2), 137-156. **Review**.
- Ravichandran A, Sugiyama N, Tomita M, Swarup S, Ishihama Y (2009). Ser/Thr/Tyr phosphoproteome analysis of pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas* species. *Proteomics*. **9**, 2764-2775.
- Ravikumar V, Shi L, Krug K, Derouiche A, Jers C, Cousin C, Kobir A, Mijakovic I, Macek B (2014). Quantitative phosphoproteome analysis of *Bacillus subtilis* reveals novel substrates of the kinase PrkC and phosphatase PrpC. *Mol. Cell. Proteomics*. **13** (8), 1965-1978.
- Reid AN, Whitfield C (2005). Functional analysis of conserved gene products involved in assembly of *Escherichia coli* capsules and exopolysaccharides: evidence for molecular recognition between Wza and Wzc for colonic acid synthesis. *J. Bacteriol.* **187**, 5470-5481.
- Ringgaard S, Schirner K, Davis BM, Waldor MK (2011). A family of ParA-like ATPases promotes cell pole maturation by facilitating polar localization of chemotaxis proteins. *Genes Dev.* **25** (14), 1544-1555.
- Roberts IS (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 285-315. **Review**.
- Roberts MA, Wadhams GH, Hadfield KA, Tickner S, Armitage JP (2012). ParA-like protein uses nonspecific chromosomal DNA binding to partition protein complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109** (17), 6698-6703.
- Rueda S, Vicente M, Mingorance J (2003). Concentration and assembly of the division ring proteins FtsZ, FtsA, and ZipA during the *Escherichia coli* cell cycle. *J. Bacteriol.* **185** (11), 3344-3351.

- Savage DF, Afonso B, Chen AH, Silver PA (2010). Spatially ordered dynamics of the bacterial carbon fixation machinery. *Science*. **327** (5970), 1258-1261.
- Schleifer KH, Kandler O (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36** (4), 407-477. **Review.**
- Schnider-Keel U, Lejbølle KB, Baehler E, Haas D, Keel C (2001). The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (12), 5683-5693.
- Schofield WB, Lim HC, Jacobs-Wagner C (2010). Cell cycle coordination and regulation of bacterial chromosome segregation dynamics by polarly localized proteins. *EMBO J.* **29** (18), 3068-3081.
- Schofield G, Whiting R, Errington J, Murray H (2011). Spo0J regulates the oligomeric state of Soj to trigger its switch from an activator to an inhibitor of DNA replication initiation. *Mol. Microbiol.* **79** (4), 1089-1100.
- Schubert HL, Fauman EB, Stuckey JA, Dixon JE, Saper MA (1995). A ligand-induced conformational change in the *Yersinia* protein tyrosine phosphatase. *Protein Sci.* **4** (9), 1904-1913.
- Sham LT, Barendt SM, Kopecky KE, Winkler ME (2011). Essential PcsB putative peptidoglycan hydrolase interacts with the essential FtsXSpn cell division protein in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108** (45), E1061-1069.
- Sham LT, Jensen KR, Bruce KE, Winkler ME (2013). Involvement of FtsE ATPase and FtsX extracellular loops 1 and 2 in FtsEX-PcsB complex function in cell division of *Streptococcus pneumoniae* D39. *MBio.* **4** (4), e00431-13.
- Sham LT, Butler EK, Lebar MD, Kahne D, Bernhardt TG, Ruiz N (2014). Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science.* **345** (6193), 220-222.
- Sharpe ME, Errington J (1996). The *Bacillus subtilis* *soj-spo0J* locus is required for a centromere-like function involved in prespore chromosome partitioning. *Mol. Microbiol.* **21** (3), 501-509.
- Shebelut CW, Guberman JM, van Teeffelen S, Yakhnina AA, Gitai Z (2010). *Caulobacter* chromosome segregation is an ordered multistep process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107** (32), 14194-14198.
- Shi L, Kobir A, Jers C, Mijakovic I (2010). Bacterial Protein-Tyrosine kinases. *Current Proteomics.* **7** (3), 188-194. **Review.**
- Shi L, Ji B, Kolar-Znika L, Boskovic A, Jadeau F, Combet C, Grangeasse C, Franjevic D, Talla E, Mijakovic I (2014). Evolution of bacterial protein-tyrosine kinases and their relaxed specificity toward substrates. *Genome Biol. Evol.* **6** (4), 800-817.
- Silver RP, Prior K, Nsahlai C, Wright LF (2001). ABC transporters and the export of capsular polysaccharides from gram-negative bacteria. *Res. Microbiol.* **152** (3-4), 357-364. **Review.**
- Singh JK, Makde RD, Kumar V, Panda D (2007). A membrane protein, EzrA, regulates assembly dynamics of FtsZ by interacting with the C-terminal tail of FtsZ. *Biochemistry.* **46** (38), 11013-11022. Erratum in: *Biochemistry.* 2008, **47** (32), 8465.
- Smith CA, Rayment I (1996). Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other P-loop proteins. *Biophys. J.* **70**, 1590-1602.
- Soufi B, Gnad F, Jensen PR, Petranovic D, Mann M, Mijakovic I, Macek B (2008a). The Ser/Thr/Tyr phosphoproteome of *Lactococcus lactis* IL1403 reveals multiply phosphorylated proteins. *Proteomics.* **8**, 3486-3493.
- Soulat D, Jault JM, Duclos B, Geourjon C, Cozzzone AJ, Grangeasse C (2006). *Staphylococcus aureus* operates protein-tyrosine phosphorylation through a specific mechanism. *J. Biol. Chem.* **281**, 14048-14056.
- Soulat D, Grangeasse C, Vaganay E, Cozzzone AJ, Duclos B (2007). UDP-acetyl-mannosamine dehydrogenase is an endogenous protein substrate of *Staphylococcus aureus* protein-tyrosine-kinase activity. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 45-54.

Soung GY, Miller JL, Koc H, Koc EC (2009). Comprehensive analysis of phosphorylated proteins of *Escherichia coli* ribosomes. *J. Proteome Res.* **8** (7), 3390-3402.

Stehle T, Sreeramulu S, Löhr F, Richter C, Saxena K, Jonker HR, Schwalbe H (2012). The apo-structure of the low molecular weight protein-tyrosine phosphatase A (MptpA) from *Mycobacterium tuberculosis* allows for better target-specific drug development. *J. Biol. Chem.* **287** (41), 34569-34582.

Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN (2000). Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183-215. **Review.**

Stouf M, Meile JC, Cornet F (2013). FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110** (27), 11157-11162.

Strauss MP, Liew AT, Turnbull L, Whitchurch CB, Monahan LG, Harry EJ (2012). 3D-SIM super resolution microscopy reveals a bead-like arrangement for FtsZ and the division machinery: implications for triggering cytokinesis. *PLoS Biol.* **10** (9), e1001389.

Sun Q, Margolin W (1998). FtsZ dynamics during the division cycle of live *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **180** (8), 2050-2056.

Sun X, Ge F, Xiao CL, Yin XF, Ge R, Zhang LH, He QY (2010). Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *J. Proteome Res.* **9**, 275-282.

Sung CK, Li H, Claverys JP, Morisson DA (2001). An *rpsL* cassette, Janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (11), 5190-5196.

Tabor S, Richardson CC (1992). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Biotechnology.* **24**, 280-284.

Tavares JR, de Souza RF, Meira GL, Gueiros-Filho FJ (2008). Cytological characterization of YpsB, a novel component of the *Bacillus subtilis* divisome. *J. Bacteriol.* **190** (21), 7096-7107.

Thanbichler M, Shapiro L (2006). MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell.* **126** (1), 147-162.

Thibessard A, Fernandez A, Gintz B, Leblond-Bourget N, Decaris B (2002). Effects of *rodA* and *pbp2b* disruption on cell morphology and oxidative stress response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *J. Bacteriol.* **184** (10), 2821-2826.

Thomasson B, Link J, Stassinopoulos AG, Burke N, Plamann L, Hartzell PL (2002). MglA, a small GTPase, interacts with a tyrosine kinase to control type IV pili-mediated motility and development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **46** (5), 1399-1413.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22** (22), 4673-4680.

Tiganis T (2002). Protein tyrosine phosphatases: dephosphorylating the epidermal growth factor receptor. *IUBMB Life.* **53** (1), 3-14. **Review.**

Tocilj A, Munger C, Proteau A, Morona R, Purins L, Ajamian E, Wagner J, Papadopoulos M, Van Den Bosch L, Rubinstein JL, Féthière J, Matte A, Cygler M (2008). Bacterial polysaccharide co-polymerases share a common framework for control of polymer length. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15** (2), 130-138.

Tonthat NK, Arold ST, Pickering BF, Van Dyke MW, Liang S, Lu Y, Beuria TK, Margolin W, Schumacher MA (2011). Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor, SlmA, keeps cytokinesis in check. *EMBO J.* **30** (1), 154-164.

Treuner-Lange A, Aguiluz K, van der Does C, Gómez-Santos N, Harms A, Schumacher D, Lenz P, Hoppert M, Kahnt J, Muñoz-Dorado J, Søgaard-Andersen L (2013). PomZ, a ParA-like protein, regulates Z-ring formation and cell division in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **87** (2), 235-253.

Troy FA 2nd (1992). Polysialylation: from bacteria to brains. *Glycobiology.* **2** (1), 5-23. **Review.**

Vicente M, García-Ovalle M (2007). Making a point: the role of DivIVA in streptococcal polar anatomy. *J. Bacteriol.* **189** (4), 1185-1188.

Vincent C, Duclos B, Grangeasse C, Vaganay E, Riberty M, Cozzone AJ, Doublet P (2000). Relationship between exopolysaccharide production and protein-tyrosine phosphorylation in gram-negative bacteria. *J. Mol. Biol.* **304**, 311-321.

Voisin S, Watson DC, Tessier L, Ding W, Foote S, Bhatia S, Kelly JF, Young NM (2007). The cytoplasmic phosphoproteome of the Gram-negative bacterium *Campylobacter jejuni*: evidence for modification by unidentified protein kinases. *Proteomics.* **7** (23), 4338-4348.

Wang JY, Koshland DE Jr (1978). Evidence for protein kinase activities in the prokaryote *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **253**, 7605-7608.

Wang X, Montero Llopis P, Rudner DZ (2013). Organization and segregation of bacterial chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* **14** (3), 191-203. **Review.**

Weinberger DM, Trzciński K, Lu YJ, Bogaert D, Brandes A, Galagan J, Anderson PW, Malley R, Lipsitch M (2009). Pneumococcal capsular polysaccharide structure predicts serotype prevalence. *PLoS Pathog.* **5** (6), e1000476.

Weinrauch Y, Msadek T, Kunst F, Dubnau D (1991). Sequence and properties of comQ, a new competence regulatory gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173** (18), 5685-5693.

Weintraub A (2003). Immunology of bacterial polysaccharide antigens. *Carbohydr. Res.* **338** (23), 2539-2547. **Review.**

Weiser JN, Austrian R, Sreenivasan PK, Masure HR (1994). Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect. Immun.* **62** (6):, 582-589.

Whitfield C, Paiment A (2003). Biosynthesis and assembly of Group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria. *Carbohydr. Res.* **338** (23), 2491-502. **Review.**

Whitfield C (2006). Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 39-68. **Review.**

Woodward R, Yi W, Li L, Zhao G, Eguchi H, Sridhar PR, Guo H, Song JK, Motari E, Cai L, Kelleher P, Liu X, Han W, Zhang W, Ding Y, Li M, Wang PG (2010). In vitro bacterial polysaccharide biosynthesis: defining the functions of Wzy and Wzz. *Nat. Chem. Biol.* **6** (6), 418-423.

Wu LJ, Errington J (2003). RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **49** (6), 1463-1475.

Wu LJ, Errington J (2004). Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell.* **117** (7), 915-925.

Wu LJ, Errington J (2011). Nucleoid occlusion and bacterial cell division. *Nat. Rev. Microbiol.* **10** (1), 8-12. **Review**

Wu LJ, Ishikawa S, Kawai Y, Oshima T, Ogasawara N, Errington J (2009). Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *EMBO J.* **28** (13), 1940-1952.

Wugeditsch T, Paiment A, Hocking J, Drummel-Smith J, Forrester C, Whitfield C (2001). Phosphorylation of Wzc, a tyrosine autokinase, is essential for assembly of group I capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**, 2361-2371.

Xayarath B, Yother J (2007). Mutations blocking side chain assembly, polymerization, or transport of a Wzy-dependent *Streptococcus pneumoniae* capsule are lethal in the absence of suppressor mutations and can affect polymer transfer to the cell wall. *J. Bacteriol.* **189** (9), 3369-3381.

Xu Q, Christen B, Chiu HJ, Jaroszewski L, Klock HE, Knuth MW, Miller MD, Elsliger MA, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Figurski DH, Shapiro L, Wilson IA (2012). Structure of the pilus assembly protein TadZ from *Eubacterium rectale*: implications for polar localization. *Mol. Microbiol.* **83** (4), 712-727.

Yother J (2011). Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 563-581. **Review**.

Zhang ZY (2005). Functional studies of protein tyrosine phosphatases with chemical approaches. *Biochim. Biophys. Acta.* **1754** (1-2), 100-107. **Review**

Zhao X, Lam JS (2002). WaaP of *Pseudomonas aeruginosa* is a novel eukaryotic type protein-tyrosine kinase as well as a sugar kinase essential for the biosynthesis of core lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **277** (7), 4722-4730.