



**HAL**  
open science

# Etude de la morphogénèse et de la division chez *Streptococcus pneumoniae*

Maxime Jacq

► **To cite this version:**

Maxime Jacq. Etude de la morphogénèse et de la division chez *Streptococcus pneumoniae*. Microbiologie et Parasitologie. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV008 . tel-01494968

**HAL Id: tel-01494968**

**<https://theses.hal.science/tel-01494968>**

Submitted on 24 Mar 2017

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

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

## **THÈSE**

Pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Virologie – Microbiologie – Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Maxime JACQ**

Thèse dirigée par **Anne Marie DI GUILMI** et  
Co-dirigée par **Cécile MORLOT**

préparée au sein du **Groupe Pneumocoque – Institut de  
Biologie Structurale – UMR 5075**  
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

## **Etude de la morphogénèse et de la division chez *Streptococcus pneumoniae*.**

Thèse soutenue publiquement le **18 avril 2016**,  
devant le jury composé de :

**Dr. Ina Attrée**

Directrice de recherche au CNRS, présidente du jury

**Dr. Nathalie Campo**

Chargée de recherche au CNRS, rapportrice

**Dr. Marcelo Nollmann**

Directeur de recherche au CNRS, rapporteur

**Dr. Christophe Grangeasse**

Directeur de recherche au CNRS, examinateur

**Dr. Cécile Morlot**

Chargé de recherche au CNRS, encadrante de thèse





# Remerciements

---

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury qui ont pris le temps de juger mon travail de thèse. Je remercie vivement les Dr. Nathalie Campo et Dr. Marcelo Nollmann d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie également le Dr. Ina Attrée d'avoir accepté de juger mon travail. Enfin, je suis également très reconnaissant envers le Dr. Christophe Grangeasse pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse mais également pour les précieux conseils prodigués lors de mes deux comités de suivi de thèse avec le Dr. Thierry Doan que je remercie par la même occasion.

Sans le financement reçu par le labex GRAL, je n'aurais pas pu effectuer ma thèse dans le groupe pneumocoque. Je tiens donc à remercier le labex GRAL (Grenoble Alliance for Integrated Structural Cell Biology) pour avoir financé ces trois merveilleuses années de travail. J'aimerais remercier par la même occasion Thierry Vernet de m'avoir fait confiance en m'acceptant dans son laboratoire puis, tout au long de ma thèse, pour les conseils scientifiques ou non scientifiques (promis, je vais faire un tour dans le Vercors dès que j'ai le temps).

Je remercie l'ensemble des « chefs » du groupe PG (Claire, Anne Marie DG., Anne Marie V, Marjo, André et Thierry). A chaque fois qu'une question me trottait dans la tête, j'ai toujours trouvé une oreille attentive (et en 3,5 ans de thèse, j'ai eu le temps de m'en poser des questions !). Merci, ce travail n'aurait sans doute pas été le même sans votre aide. Plus particulièrement, merci à Marjolaine et Anne Marie V. pour leur aide pour l'utilisation du robot et les expériences de cell free, André pour son scepticisme (surtout sur Pmp23), ses discussions et son aide scientifique constante, Claire pour m'avoir autorisé à entrevoir un petit peu de son « autre monde » qu'est l'enseignement et enfin Anne Marie DG qui a été ma directrice de thèse sur le papier mais aussi en réalité par ses conseils et sa disponibilité. Merci à Yves pour sa bonne humeur communicative, ses bonnes idées et sa technique de resuspension de culot « wasabi ».

Mes remerciements envers l'ensemble des chefs du groupe PG ne serait pas complet sans mentionner ma directrice de thèse, Cécile Morlot. Travailler avec toi fut une expérience enrichissante à tout point de vue, humaine et scientifique. Tu as su me faire confiance et me laisser expérimenter mes propres idées tout en me guidant et m'encadrant quand il le fallait. Merci également à Cyril qui a fait la connexion avec Cécile et a poussé ma candidature pour

cette thèse. Je suis persuadé que si je n'avais pas croisé ta route, je n'aurais pas forcément eu la même approche à la science et au laboratoire. Je remercie toute la famille Morlot/Boyault (Bahia, June et Enki) pour les heures prises sur le temps de famille dues aux corrections de ce manuscrit.

Je souhaite remercier les membres de l'équipe Pixel pour leur accueil constant que ce soit dans les bâtiments du CEA ou dans le bureau voisin à l'IBS2. Un grand remerciement à Virgile et Dominique, j'ai beaucoup appris à vos côtés. Cette collaboration fut, pour moi, une grande satisfaction par la découverte du monde de la super-résolution. Merci beaucoup à Virgile pour la relecture de la partie microscopie et pour sa bonne humeur quotidienne.

Un grand merci au reste du groupe PG. Merci à toi, Laure, pour ton accueil dans l'équipe. Beaucoup de choses ont changé en 3 ans (mariage, Louis, ...), je te souhaite le meilleur à suivre. Merci à l'ensemble des membres passés (Lucie, Violaine, Guillaume, Flo, Jennifer, Justine et Charlène) qui ont animé le laboratoire. Merci à Flo et Jenni pour leurs vidéos de départ. Je n'oublie pas les thésards/post-docs (Rachel, Julie, Rémi, Xavier, Jules, Jimmy, Christopher et Philippe) ainsi que Ambre et Benjamin qui ont rendu encore plus plaisantes ces années. Merci à Rémi pour ses connaissances scientifiques inépuisables, à Jules pour sa bonne humeur constante et à Xavier pour les conversations et simplement pour être toi. Merci à Julie pour le temps passé au bureau, pour la déconcentration mutuelle, les discussions mais aussi les séances de réflexion sur nos sujets respectifs. Merci aux thésards de l'IBS et particulièrement à Elise pour les pauses café toujours appréciables. Merci à tous pour les afterworks à la Passoire, au Carré, O'Callaghan, ... et pour les soirées prévues ou non. Merci pour les invitations aux thésards de l'IAB et surtout au M&Ms de l'équipe 13.

En dehors du laboratoire, il est toujours difficile d'être compris par son entourage par rapport à son travail et le dévouement qui va avec alors je vous remercie, chers amis, pour votre patience et vos inquiétudes. Merci aux colloqs pour leur soutien au cours des années (Marie, Ariane, Tiph, Bibi, Marion, Pierrot, Elo, Pico, Anais). Merci aux partenaires de nouvel an et de jeux (John, Ben, Martin,..) et particulièrement à John pour les corrections « d'otograf ». Au groupe des montiliens (Céline, Momo, Romain, Clément, Marine-Océane, Benoit, ...). Merci pour cette amitié depuis plus de 10 ans. Merci de prendre le temps de perpétuer cette amitié malgré la distance. Céline, Momo, j'ai enfin fini mes études. Merci aux PES et à Cachin. Je n'allais pas oublier de remercier Emeline, Natacha, Vincent et Victor, témoins en or de notre mariage avec Sabine.

Je tiens à remercier ma famille pour sa compréhension ou tout au moins sa patience. Tout d'abord, mes parents qui m'ont éduqué permettant de me développer et de m'ouvrir au monde quand il le fallait. Merci de m'avoir fait découvrir le monde en partant au Japon durant ces quelques années et aux nombreux voyages. Merci d'avoir soutenu (moralement et financièrement) mes études. Merci pour votre soutien inconditionnel depuis toutes ces années et d'autant plus depuis le début de cette thèse. Merci à ma famille (frère, belle-sœur, marraine, parrain, oncle, tante, grands-mères,...) que je ne vois que trop rarement mais qui me pardonne mes absences. Merci aux parents de Sabine de m'avoir accueilli comme leur enfant. Merci à Delphine et Stéphane pour les découvertes culinaires allemandes mais surtout Félicitations pour la naissance du petit Raphaël. Enfin, il ne me reste qu'une personne à remercier et la plus importante à mes yeux, Sabine. Que de chemins parcourus depuis la licence de Bio, je ne changerais cela pour rien au monde. Depuis 6 ans, tu es à mes côtés pour m'épauler et m'aider. Merci pour ta patience lors de mes absences physiques (à finir une acquisition PALM à 21h) ou mentales. Tu as été présente à chaque étape de ma thèse à m'écouter sur mes théories et mes expériences et même jusqu'à la correction de ce manuscrit. Ici s'amorce la fin d'un chapitre débuté il y a déjà trois ans et demi. Tout simplement, Merci de tout mon cœur.



# Contribution aux travaux

---

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

Dans la publication présentée en annexe, j'ai effectué les tests d'activité de PBP2x en présence de StkP, une expérience de co-immunoprécipitation entre PBP2x et StkP (avec l'aide de Lucie Bayle) et l'observation de différentes souches en microscopie à fluorescence.

Dans la publication n°I, l'ensemble des constructions et des expériences ont été réalisées par moi-même. L'optimisation de la séquence codante de Dendra2 a été effectuée par Cécile Morlot. La microscopie électronique en coloration négative a été réalisée en collaboration avec Christine Moriscot. Le montage du microscope PALM et le support technique pour l'acquisition de données ont été réalisés par Virgile Adam. Les programmes informatiques utilisés pour la localisation des molécules uniques et la reconstruction de l'image PALM finale ont été fournis par Dominique Bourgeois. L'analyse des données PALM, la rédaction des programmes pour l'analyse des dimensions de l'anneau Z ont été effectuées par moi-même, avec l'aide de Dominique Bourgeois et Virgile Adam.

Dans la publication n°II, j'ai effectué l'ensemble des expériences de génétique, de biochimie, de microbiologie cellulaire et de microscopie à fluorescence, à l'exception des travaux sous cités. La modélisation de la structure de Pmp23 a été effectuée par Cécile Morlot. Les sondes permettant le marquage du peptidoglycane ont été synthétisées par Yves V. Brun et Michael S. VanNieuwenhze. Pour le marquage du peptidoglycane néo-synthétisée, les souches de pneumocoques et les expériences de microscopie ont été réalisées par Christopher Arthaud. Sylvie Manuse et Christophe Grangeasse ont fourni une partie des souches qui ont permis cette étude. Katarina Peters et Waldemar Vollmer ont effectué l'analyse du peptidoglycane.





# Abréviations

---

ADN:	Acide deoxyribonucleique
ARN:	Acide ribonucleique
CBP :	Protéines liant la choline (Choline-Binding Protein)
CSP:	Peptide de stimulation de la compétence (Competence-Stimulating Peptide)
GlcNAc:	<i>N</i> -acetylglucosamine
GFP:	Protéine Fluorescente Verte (Green Fluorescent Protein)
GTP:	Guanosine TriPhosphate
GDP:	Guanosine DiPhosphate
h:	Heure
k:	Kilo
LTA:	Acide téichoïques liés à la membrane lipidique (LipoTeichoic Acids)
mm:	Millimètre
µm:	Micromètre
M:	Molar (mole / litre)
min:	Minute
MurNAc:	Acide <i>N</i> -acetylmuramique
nm:	Nanomètre
OD:	Densité Optique
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
ORL:	Oto-rhino-larynx
PALM:	PhotoActivated Localization Microscopy
PBP:	Protéines liant la pénicilline (Penicillin-Binding Protein)
PBS:	Tampon Phosphate Salin (Phosphate Buffer Saline)
PG:	Peptidoglycane
rpm:	Rotation par minute
SIM:	Structured Illumination Microscopy
STORM:	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
RESOLFT:	REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions
UV:	Ultra-Violet
VIH:	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WTA:	Acide téichoïques liés à la paroi (Wall Teichoic Acids)

# Table des matières

---

REMERCIEMENTS .....	1
CONTRIBUTION AUX TRAVAUX .....	5
ABREVIATIONS.....	7
TABLE DES MATIERES .....	8
INTRODUCTION.....	13
<b>I. INTRODUCTION GENERALE : DECOUVERTE DES BACTERIES ET DU PNEUMOCOQUE .....</b>	<b>13</b>
A. Historique.....	13
B. Le cas du pneumocoque.....	14
<b>II. LE PNEUMOCOQUE .....</b>	<b>15</b>
A. Phylogénie et classification.....	15
B. Epidémiologie et santé publique.....	16
C. Aspects caractéristiques du pneumocoque .....	18
i. Morphologie, croissance et autolyse .....	18
ii. La capsule .....	20
iii. Mécanisme d'intégration de l'ADN : la compétence .....	20
<b>III. LA DIVISION BACTERIENNE ET LA FORME DES BACTERIES.....</b>	<b>21</b>
A. Généralités sur la division bactérienne.....	21
i. Duplication et séparation de l'ADN.....	22
ii. Synthèse du peptidoglycane et constriction de la membrane .....	23
iii. Fermeture du septum et séparation des cellules filles.....	25
B. Le cytosquelette bactérien .....	26
i. Généralités .....	26
ii. FtsZ.....	28
1. Polymérisation de FtsZ <i>in vitro</i> .....	30
2. Structure de l'anneau Z <i>in vivo</i> .....	30
3. Système de positionnement de l'anneau Z .....	34
4. FtsZ chez <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	36
a. Localisation et dynamique de l'anneau Z chez le pneumocoque .....	36
b. Protéines en interaction directe avec l'anneau Z chez <i>S. pneumoniae</i> .....	38
C. La paroi bactérienne .....	46
i. Gram positif et Gram négatif .....	46
ii. Composition de la paroi du pneumocoque .....	47
1. Le peptidoglycane .....	47
2. Les acides téichoïques.....	49
iii. Synthèse du peptidoglycane chez <i>S. pneumoniae</i> .....	51
1. Synthèse du précurseur et flippases .....	51
2. Incorporations des précurseurs à l'ancien peptidoglycane .....	51
D. Remodelage et maturation de la paroi .....	53
i. Dégradation du peptidoglycane.....	53
ii. Les hydrolases de <i>S. pneumoniae</i> .....	55
1. Hydrolases impliquées dans l'autolyse et le fratricide .....	57
2. Hydrolases impliquées dans la division.....	59
3. Hydrolases de fonction inconnue .....	61
iii. Modification des chaînes glycanes.....	61
1. N-déacétylation .....	62
2. O-acétylation .....	63
3. N-glycosylation .....	64

<b>IV. MICROSCOPIE OPTIQUE DE FLUORESCENCE</b> .....	<b>64</b>
A. Généralités .....	64
i. Historique.....	64
ii. Principes fondamentaux et limite de résolution.....	65
iii. Fluorescence .....	67
B. Nouvelles techniques d'imagerie super-résolue .....	68
C. Microscopie PALM/STORM.....	70
i. Principes.....	70
ii. Applications chez les bactéries.....	73
iii. Artefacts en microscopie à molécules uniques.....	75
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>78</b>
<i>Culture de S. pneumoniae et méthodes de fixation</i> .....	78
<i>Conditions d'acquisition</i> .....	78
<i>Localisation des molécules uniques et reconstruction de l'image PALM</i> .....	79
<i>Analyse de la géométrie de l'anneau Z et comptage du nombre de molécules</i> .....	80
<b>RESULTATS</b> .....	<b>83</b>
<b>PRESENTATION DE LA PUBLICATION N° I</b> .....	<b>83</b>
<i>Contexte et objectifs de l'étude</i> .....	83
<i>Résultats</i> .....	84
<i>Conclusion</i> .....	86
<i>Publication n° I :</i> .....	87
<i>Remodeling of the Z-ring nanostructure during the Streptococcus pneumoniae cell cycle revealed by photoactivated localization microscopy</i> .....	87
<b>PRESENTATION DE LA PUBLICATION N° II</b> .....	<b>108</b>
<i>Contexte et objectifs de l'étude</i> .....	108
<i>Résultats</i> .....	108
<i>Conclusion</i> .....	111
<i>Publication n° II :</i> .....	112
<i>A new connection between cell wall metabolism and cell division in S. pneumoniae</i> .....	112
<i>A new connection between cell wall metabolism and cell division in S. pneumoniae</i> .....	113
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>145</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>151</b>
<i>Annexe n°I : Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in Streptococcus pneumoniae R6 morphogenesis.</i> .....	151
<i>Annexe n°II : Scripts Matlab : calcul du diamètre de l'anneau Z.</i> .....	175
<i>Annexe n°III : Scripts Matlab : calcul de la largeur de l'anneau Z.</i> .....	177
<i>Annexe n°III : Scripts ImageJ : Destacking.txt</i> .....	178
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>181</b>
<b>RESUME / SUMMARY</b> .....	



CHIRURGIE. — De l'influence des découvertes de M. Pasteur sur les progrès de la Chirurgie. Note de M. C. SÉDILLOT.

« M. Pasteur a démontré que des organismes microscopiques, répandus dans l'atmosphère, sont la cause des fermentations attribuées à l'air qui n'en est que le véhicule et ne possède aucune de leurs propriétés.

» Ces organismes forment tout un monde, composé d'espèces, de familles et de variétés, dont l'histoire, à peine commencée, est déjà féconde en prévisions et en résultats de la plus haute importance.

» Les noms de ces organismes sont très-nombreux <sup>(1)</sup> et devront être définis et, en partie, réformés. Le mot *microbe* <sup>(2)</sup> ayant l'avantage d'être plus court et d'une signification plus générale, et mon illustre ami, M. Littré, le linguiste de France le plus compétent, l'ayant approuvé, nous l'adoptons, sans néanmoins renoncer à ceux en usage, pour la désignation de variétés plus particulièrement étudiées.

» La démonstration des microbes et de leur rôle, dont l'Académie a été juge et témoin, a jeté un rayon de vive lumière dans les obscurités et les fausses et contradictoires appréciations où s'égarait la Chirurgie.

Dès la plus haute antiquité la Médecine a compris et formulé l'influence prépondérante de l'air sur la vie, la santé et les maladies.

» Le temps, malgré les immenses progrès de la Science, n'avait rien changé à ce point de vue jusqu'au moment où les découvertes de M. Pasteur l'ont complètement éclairé et ont profondément modifié l'état de la Chi-

---

<sup>(1)</sup> *Synonymie* : microzoaires, microphytes, aérobies, anaérobies, microgermes, micrococci, microzymas, bactéries, bactériidies, vibrions, microdermes, conferves, ferments, monades, animalcules, corpuscules, torules, *penicillium*, *aspergillus*, infusoires, *leptothrix*, *leptothricum*, spores de l'achorium, de favus, de l'oïdium, du muguet, organismes de l'acide tartrique droit et gauche, zymases septiques et septicémiques, etc.

<sup>(2)</sup> *Μικρός*, petit; *βίος*, vie.

Compte rendu de la séance de l'Académie des Sciences au cours de laquelle C. Sédillot définit le terme « microbe » pour désigner des micro-organismes



# Introduction

---

## I. Introduction générale : découverte des bactéries et du pneumocoque

### A. Historique

Pendant longtemps, l'apparition de maladies était une fatalité car elles ne pouvaient être évitées. La croyance de l'époque voulait qu'elles soient le fruit de la génération spontanée, c'est-à-dire un évènement au cours duquel un organisme apparaissait sans germe ou sans ascendant préexistant, produit par une force inconnue.

Au XVIème siècle, le médecin Girolamo Fracastor publie un ouvrage révolutionnaire, « De la contagion et des maladies infectieuses » (*De Contagione et Contagiosis Morbis*), dans lequel il décrit plusieurs maladies telles que la tuberculose, la lèpre ou encore la syphilis. Dans une époque où la théorie de la génération spontanée prédomine encore, il propose une théorie novatrice selon laquelle les maladies infectieuses proviendraient d'organismes vivants (« *seminaria contagionis* ») invisibles à l'œil nu, capables de se transmettre entre individus et surtout capables de se reproduire. Fracastor venait de décrire l'ensemble des micro-organismes et leurs caractéristiques en se basant uniquement sur l'observation des maladies infectieuses. Ces organismes se transmettraient par deux voies différentes :

- Directe, par simple contact entre personnes contaminées et personnes saines
- Indirecte, par l'air ou des objets contaminés,

Par ailleurs, il nota que la transmission se faisait préférentiellement entre individus ayant des prédispositions à la maladie, entre les membres d'une même famille par exemple. Sa théorie ne fut pas communément admise car il ne put obtenir de preuves expérimentales de l'existence des bactéries et des virus.

Il fallut attendre un siècle pour qu'en 1668, Antoni Van Leeuwenhoek fabrique un microscope capable de les observer. Il put ainsi observer pour la première fois de nombreux organismes et cellules, tels des spermatozoïdes, des globules rouges et des levures. En 1683, il



fut le premier à décrire l'existence d'organismes minuscules, nommés « animalcules », qu'il découvrit dans des environnements variés, allant de la goutte de pluie à la plaque dentaire. Il est considéré comme le père de la microbiologie grâce à cette découverte. En 1829, Christian Gottfried Ehrenberg poursuivit les travaux initiés par Van Leeuwenhoek et nomma ces organismes « bactéries ».

Les grandes découvertes du XIX<sup>ème</sup> siècle en microbiologie furent faites par Louis Pasteur avec la découverte du staphylocoque, et par Robert Koch avec la description du bacille du Charbon (*Bacillus anthracis*), la bactérie responsable de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) et le vibron du choléra (*Vibrio cholerae*). Ils ont ainsi démontré la validité de la théorie microbienne et réfuté la théorie de la génération spontanée. Tous deux sont également à l'origine de nombreux concepts de santé publique (des mesures sanitaires d'hygiène, la vaccination ou encore la pasteurisation).

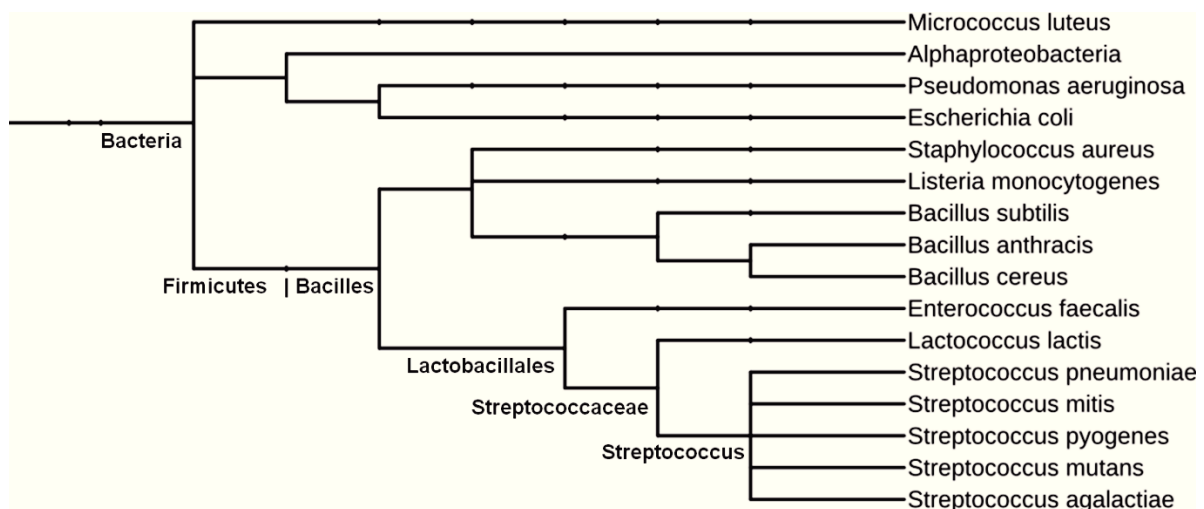
## **B. Le cas du pneumocoque**

En 1881, indépendamment, Louis Pasteur et George Miller Sternberg découvrirent de manière fortuite le pneumocoque (Watson et al., 1993). Louis Pasteur, tentant d'isoler l'agent responsable de la rage, inocula la salive d'un patient mort de cette maladie à des lapins. Il observa alors un « organisme microscopique nouveau », retrouvé dans le sang des lapins morts, « qui a pu être cultivé dans le bouillon de veau » et qui provoquait des symptômes différents de la rage (Pasteur, 1881). Durant la même année, George Sternberg fit des expériences similaires au cours desquelles il inocula sa propre salive comme contrôle négatif. A la suite de la mort rapide du lapin, il observa lui-aussi dans le sang du lapin un organisme qu'il nomma *Micrococci pasteurii* (Sternberg, 1881). Pasteur et Sternberg avaient découvert le pneumocoque. Il fallut attendre 1886 pour avoir la démonstration, par un scientifique allemand du nom d'Albert Fraenkel, du rôle de cette bactérie dans les pneumonies. *Micrococci pasteurii* fut alors renommée *Pneumococcus* (Fraenkel, 1886). Le pneumocoque changea encore deux fois de dénomination, le nom de *Diplococcus pneumoniae* lui fut d'abord donné pour sa morphologie en diplocoque (Winslow et al., 1920) puis, 55 ans plus tard, il fut finalement nommé *Streptococcus pneumoniae* pour sa capacité à former des chaînes lors de cultures liquides (Deibel and Seeley, 1974).

## II. Le pneumocoque

### A. Phylogénie et classification

Le pneumocoque fait partie du phylum des *Firmicutes* (du latin *firmus* et *cutis*, qui signifient respectivement « solide » et « peau », essentiellement des bactéries à Gram positif), de la classe des *Bacilles* (aérobies facultatifs), ordre des *Lactobacillales*. Au sein de l'ordre des *Lactobacillales*, il appartient à la famille des *Streptococcaceae*, du genre *Streptococcus* (Fig. 1). Le genre *Streptococcus* est divisé en 6 groupes phylogéniques (classement selon ARN 16S) : *pyogenic*, *bovis*, *salivarius*, *angonosus*, *mutans* et *mitis*. L'ensemble des espèces comprises dans le groupe *mitis*, dont *S. pneumoniae*, sont retrouvées dans la cavité orale ou le nasopharynx.



**Figure 1** : arbre phylogénique de la branche des eubactéries, ne montrant qu'une sélection d'espèces bactériennes mentionnées dans ce manuscrit. Généré à partir du logiciel iTOL (Letunic and Bork, 2011)

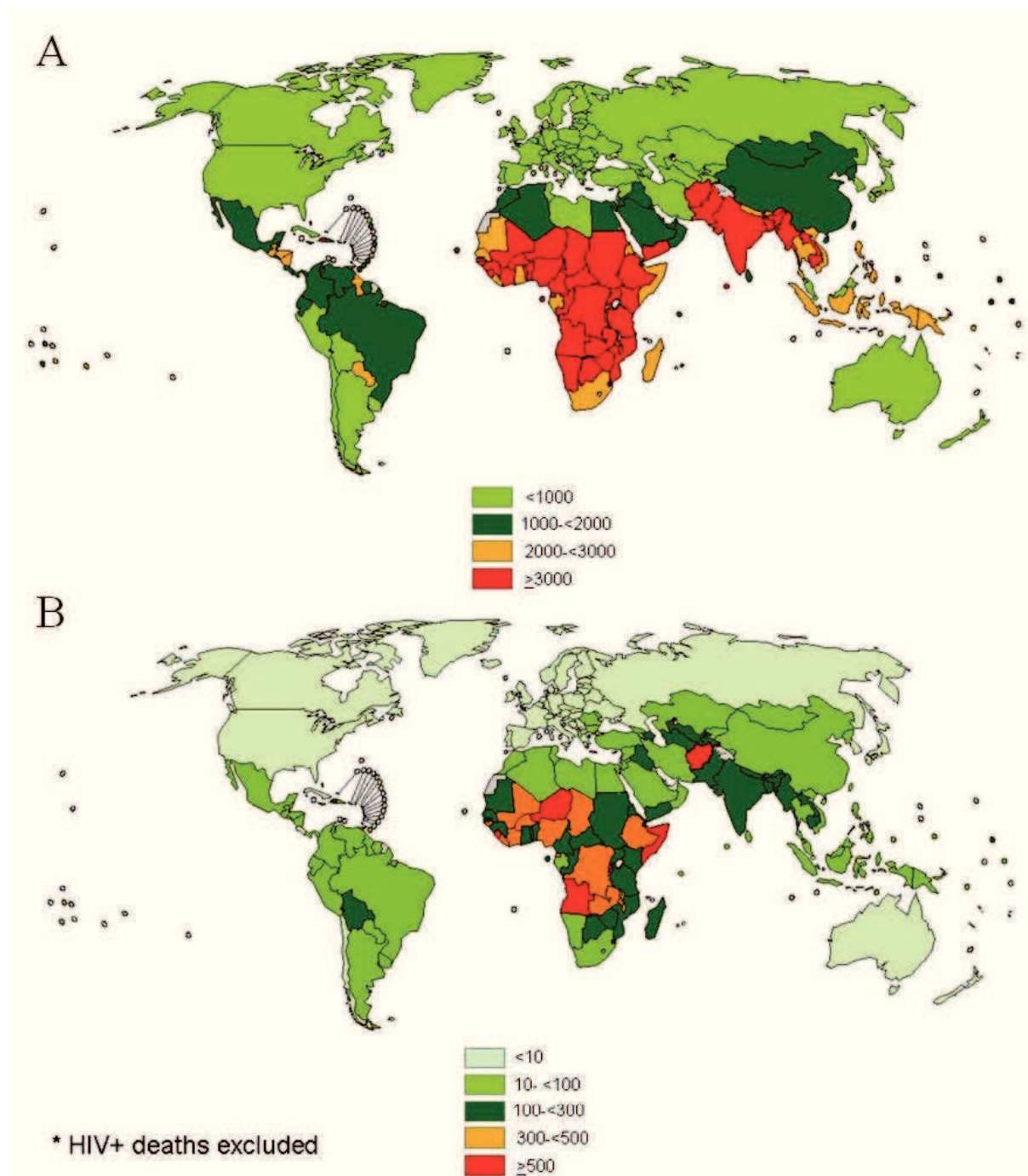
Le genre *Streptococcus* comprend de nombreuses espèces bactériennes commensales, notamment de la cavité buccale (*S. mitis*, *S. sanguis*, *S. mutans*,...). Ce genre comprend également des espèces pathogènes telles que *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* ou *S. pyogenes*. La classification phylogénique permet de réunir les espèces selon leurs similitudes génomiques. D'autres classifications existent dont l'une spécifique au genre *Streptococcus*, définie par Rebecca Lancefield en 1933, classifient les espèces dans des groupes allant de A à G et N. Ce système de classification se base sur la structure antigénique des parois des streptocoques contenant des antigènes particuliers pour chaque groupe. L'antigène principal fut nommé substance C et peut être de nature polysaccharidique ou être un acide lipotéichoïque. Les

streptocoques, dépourvus de polyoside C, sont dits "non groupables". Les plus connus sont les groupes A et B, qui comportent une seule espèce, respectivement *S. pyogenes* et *S. agalactiae*. Pour ces raisons, ces bactéries sont le plus souvent nommées : « streptocoque de groupe A » ou « streptocoque de groupe B ». Le streptocoque de groupe A est responsable de différentes infections invasives comme des angines, la scarlatine, l'impétigo ou d'autres infections cutanées nécrosantes, le syndrome de choc toxique, certaines bactériémies et méningites. Le streptocoque de groupe B est, quant à lui, responsable de différentes infections génito-urinaires chez l'homme et de mammites chez les bovidés. R. Lancefield n'a pas défini de groupe spécifique pour le pneumocoque mais il est caractérisé par des antigènes spécifiques de sa capsule qui permettent de l'identifier.

## **B. Epidémiologie et santé publique**

*S. pneumoniae* est une bactérie commensale du nasopharynx chez de nombreux mammifères (van der Linden et al., 2009). Présente de manière asymptomatique au niveau du nasopharynx, elle peut être un pathogène humain sévère l'homme lorsqu'elle envahit des zones normalement stériles.

D'après une estimation de l'organisation mondiale de la santé (OMS), 1.6 million de personnes meurent chaque année dans le monde de maladies liées au pneumocoque. Les populations à risque sont principalement les personnes ayant un système immunitaire faible (enfants de moins de 5 ans, personnes âgées) ou affaiblies par une infection (porteurs du VIH). En effet, l'incidence des infections dues au pneumocoque serait 20 à 40 fois plus élevée chez les adultes immunodéprimés par rapport aux adultes sains (Kyaw et al., 2005). La pneumonie, maladie dont le pneumocoque est l'agent principal (50% des cas), est la première cause de décès des enfants de moins de 5 ans (30% des décès de cette tranche d'âge). En 2006, l'OMS et l'Unicef ont publié conjointement un recueil intitulé « Pneumonia : The forgotten killer of children » pour alerter sur l'incidence et la mortalité de cette infection qui touche principalement les pays en voie de développement d'Afrique subsaharienne et d'Asie (Fig. 2).



**Figure 2 :** incidence (A) et mortalité (B) liées au pneumocoque pour 100 000 enfants de moins de 5 ans dans le monde (Source: WHO, 2000).

Le pneumocoque colonise la flore commensale lors de la première année de vie (Aniansson et al., 1992; Gray and Dillon, 1989). Par la suite, il est présent de façon asymptomatique dans la population des pays riches à un taux de 30-50% chez les enfants et 5-20% chez les adultes. Dans les pays en voie de développement, il est présent à un taux de 80-90% chez les enfants et environ 50% chez les adultes (Adegbola et al., 2014; Gilley and Orihuela, 2014; Mackenzie et al., 2010).

La transition de l'état commensal à l'état virulent n'est pas encore totalement élucidée mais il semblerait que suite à une diminution des défenses de l'hôte, le pneumocoque puisse coloniser des organes qui sont normalement stériles (sphère ORL, poumons, sang ou cerveau), causant différentes infections et provoquant des maladies plus ou moins graves en fonction du site d'infection. Cette diminution des défenses de l'hôte résulte à la fois d'une diminution du système immunitaire et d'une altération des défenses mécaniques des voies respiratoires (toux, drainage par l'appareil muco-ciliaire).

Les infections de moindre gravité et de plus forte incidence incluent des otites moyennes, des sinusites ou encore des bronchites. Les autres infections correspondent à trois types d'infections : pneumonies, méningites ou septicémies. Les pneumonies dues au pneumocoque représentent 30 à 50% des pneumonies bactériennes, le reste des pneumonies étant essentiellement dues à la bactérie *Haemophilus influenzae* ou au virus respiratoire syncytial. Le passage du pneumocoque dans la voie sanguine est encore mal compris mais il semble qu'il s'effectuerait à partir d'un organe infecté (poumons, sphère ORL). Une fois dans le sang, le pneumocoque peut atteindre différents organes, et notamment le cerveau, provoquant une méningite. La méningite est une inflammation des membranes qui enveloppent le cerveau et la moelle épinière, ainsi que du liquide céphalorachidien. La dissémination du pneumocoque par voie sanguine peut enfin atteindre l'ensemble de l'organisme, provoquant une septicémie.

Une étude souligne qu'aux Etats-Unis, le pneumocoque est la première cause d'otite moyenne aiguë et cause environ 17 000 cas de maladies invasives (septicémies et méningites) chez les enfants de moins de 5 ans chaque année, dont 700 cas de méningite et 200 décès (O'Brien et Dagan, 2003). En France, dans les années 2000, les maladies invasives dues au pneumocoque étaient estimées à 132 000 pneumonies, 5 000 septicémies et 400-500 méningites par an (Black et al., 2004; Gaillat, 1998).

## **C. Aspects caractéristiques du pneumocoque**

### **i. Morphologie, croissance et autolyse**

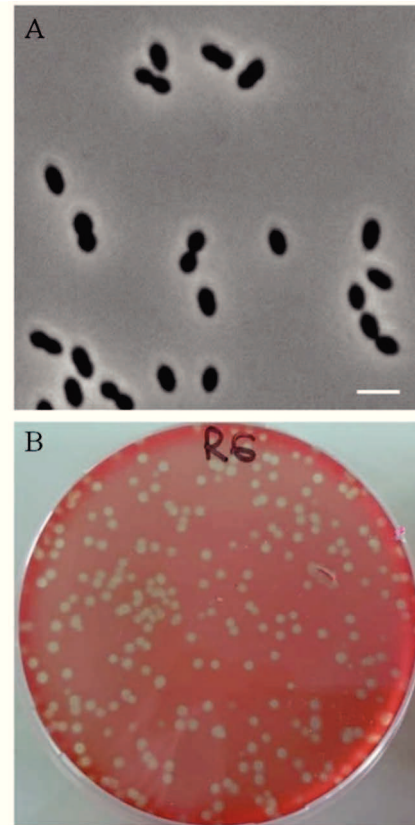
*S. pneumoniae* est une bactérie diplocoque de forme ovoïde, d'une taille comprise entre 1 et 2  $\mu\text{m}$  et qui ne forme pas de spores (Fig. 3A). En laboratoire, elle se cultive entre 30 et 37°C, préférentiellement en atmosphère anaérobie mais elle tolère toutefois l'oxygène. En milieu liquide (sans agitation) à 37°C, elle possède un temps de génération d'environ 40

minutes. Elle peut également être cultivée sur des géloses de sang, sur lesquelles elle forme des colonies caractérisées par une zone d'hémolyse incomplète (Fig. 3B). Le pneumocoque est en effet une bactérie dite alpha-hémolytique car elle ne dégrade pas totalement l'hémoglobine, contrairement aux bactéries bêta-hémolytique qui dégradent les globules rouges grâce à l'enzyme streptolysine O.

Le pneumocoque possède une autre propriété particulière, l'autolyse. En milieu liquide, après une phase de croissance stationnaire courte, les bactéries perdent de leur viabilité (Mellroth et al., 2012), puis la densité optique commence à décroître. Cette décroissance est due à la lyse de la population cellulaire par une enzyme de dégradation de la paroi, l'autolysine LytA.

LytA est présente dans le cytoplasme de la bactérie en phase de croissance exponentielle, elle est ensuite libérée dans le milieu extérieur lors de la mort de la cellule. Elle se lie sur des structures spécifiques de la paroi cellulaire (la choline portée par les acides téichoïques, voir le sous-paragraphe III.C.ii.1) pour cliver le composant majoritaire de cette dernière, le peptidoglycane, provoquant la lyse de la bactérie.

Le rôle de la protéine LytA est multiple. LytA est d'abord impliquée dans un système d'intégration d'ADN, la compétence. LytA permet au pneumocoque de lyser une partie de sa population (phénomène de fratricide), ce qui libère une grosse quantité d'ADN, potentiellement intégré au génome des bactéries survivantes en phase de compétence (Moscoso et al., 2006). L'intégration de cet ADN exogène confère au pneumocoque une forte capacité d'évolution. Cet avantage sélectif se traduit notamment par l'acquisition de marqueurs de résistance en présence d'antibiotiques. L'ADN libéré dans le milieu extérieur, en plus d'être récupéré par les bactéries compétentes, pourrait également participer à la formation de biofilms bactériens (Domenech et al., 2012). La lyse des bactéries entraîne par ailleurs la libération de fragments de peptidoglycane et de nombreuses protéines à caractère



**Figure 3 :** A) Image de microscopie en contraste de phase de *S. pneumoniae*. Barre d'échelle : 2  $\mu$ m. B) Photographie d'une boîte de pétri contenant des colonies de *Streptococcus pneumoniae*. La plage de lyse est visible autour de la colonie.

immunogène (Royet and Dziarski, 2007). Ces éléments relâchés dans le milieu extérieur ont la capacité de lier les molécules du complément et les cytokines, diminuant la disponibilité de ces molécules pour la reconnaissance et la phagocytose des cellules de pneumocoque (Hirst et al., 2008; Martner et al., 2009; Ramos-Sevillano et al., 2015). Par ailleurs, la toxine pneumolysine libérée au cours de la lyse va avoir un rôle important dans la virulence du pneumocoque en formant des pores dans les cellules hôtes.

## **ii. La capsule**

A sa surface, le pneumocoque possède deux structures majeures : la paroi cellulaire et la capsule. La paroi cellulaire sera détaillée ultérieurement dans la section III.C.

La capsule est la couche de l'enveloppe cellulaire la plus externe. Il s'agit d'une structure polysaccharidique, surplombant la paroi cellulaire à laquelle elle est liée de façon covalente (Sørensen et al., 1990). Elle a une épaisseur comprise entre 200 et 400 nm (Skov Sørensen et al., 1988), qui varie selon les souches de pneumocoque. Elle joue un rôle déterminant dans la virulence de la bactérie, notamment en limitant le dépôt de molécules du complément à sa surface, lui permettant d'échapper à la phagocytose (Abeyta et al., 2003; Avery and Dubos, 1931; Hyams et al., 2010). Les variations dans la composition saccharidique de la capsule permettent une classification des souches de pneumocoques en 97 sérotypes (pour revue, voir Geno et al., 2015).

## **iii. Mécanisme d'intégration de l'ADN : la compétence**

Une caractéristique particulièrement intéressante du pneumocoque est sa capacité à intégrer, dans son génome, de l'ADN étranger présent dans son environnement. Cette propriété, appelée compétence et conservée dans le genre *Streptococcus* (Berg et al., 2011), fut décrite en 1928 pour la première fois par Frederick Griffith chez *S. pneumoniae* (Griffith, 1928).

La compétence est retrouvée chez de nombreuses autres bactéries et a été principalement étudiée chez *Bacillus subtilis*, *Neisseria Gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* (Solomon and Grossman, 1996) et bien entendu chez *S. pneumoniae*. Exceptée *N. Gonorrhoeae* qui est constitutivement compétente (Jyssum, 1966), les bactéries ne sont transformable que pendant une courte durée (Claverys et al., 2006). La compétence est un

phénomène transitoire qui apparaît, chez le pneumocoque, en début de phase exponentielle et dure environ 20 minutes. L'entrée en compétence est déclenchée par un peptide de 17 acides aminés nommé Peptide de Stimulation de la Compétence (CSP) (Pakula and Walczak, 1963; Håvarstein et al., 1995). Le CSP se fixe sur le système de transduction de signal à deux composants ComD/ComE, entraînant une cascade transcriptionnelle et la synthèse de protéines impliquées dans le fratricide ainsi que dans l'entrée et la recombinaison d'ADN étranger (Johnsborg and Håvarstein, 2009a; Pestova et al., 1996).

En laboratoire, ce phénomène permet de manipuler facilement le génome du pneumocoque à des fins de recherche. Dans les conditions physiopathologiques, la compétence et la plasticité génétique du pneumocoque lui permettent d'utiliser l'ADN environnant pour s'adapter à son milieu. Ce potentiel d'évolution génétique lui permet par exemple de modifier la composition de sa capsule pour échapper au système immunitaire, ou de modifier la séquence codant pour les protéines cibles des antibiotiques, exprimant ainsi des protéines mutées, d'affinité réduite pour les antibiotiques, pour survivre à la présence d'antibiotiques (Johnston et al., 2014).

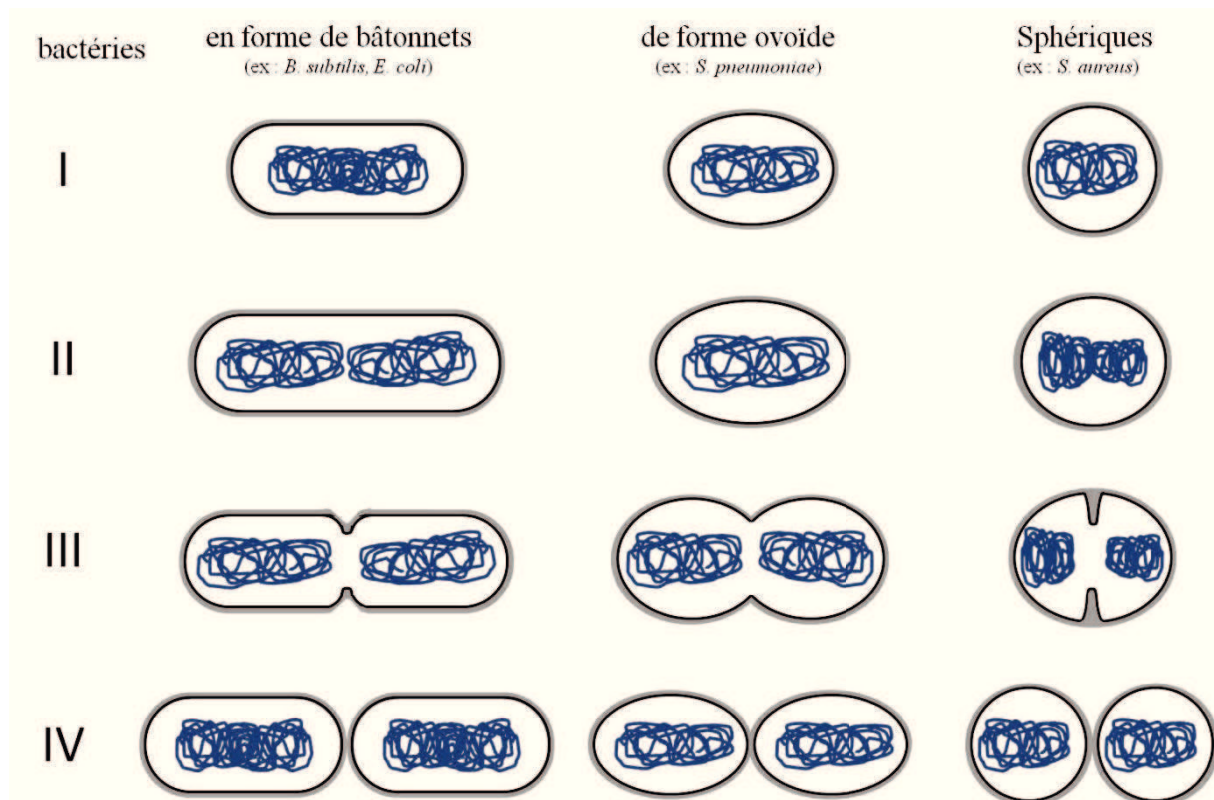
### **III. La division bactérienne et la forme des bactéries**

#### **A. Généralités sur la division bactérienne**

La division cellulaire est un processus essentiel à toutes les formes de vie. La plupart des bactéries se divisent par fission binaire. Lors de la division bactérienne, de nombreux processus sont nécessaires à la création de deux cellules filles identiques à la cellule mère (Fig. 4). Ces processus incluent principalement:

- la réplication et ségrégation du chromosome
- la constriction de la membrane plasmique
- la synthèse de la paroi
- l'hydrolyse ménagée du peptidoglycane septal, permettant la séparation des cellules filles





**Figure 4** : Les différentes étapes de la division bactérienne chez des organismes de formes différentes (bâtonnet, ovoïde ou sphérique). Après répllication du chromosome (I), l'expansion du peptidoglycane (II) est couplée à la ségrégation de l'ADN dans les futures cellules filles. La constriction de la membrane plasmique et la synthèse de peptidoglycane septal (III) vont séparer les cellules filles en deux compartiments distincts. A la fin du cycle cellulaire, les membranes fusionnent et une partie du peptidoglycane septal est digérée, permettant la séparation des cellules filles (IV).

Certaines de ces étapes se chevauchent dans le temps et beaucoup sont interdépendantes (Haeusser and Levin, 2008; Nordstrom et al., 1991). Le bon déroulement du cycle cellulaire repose sur la coordination des différents processus de la division au sein de complexes macromoléculaires composés de protéines aux fonctions enzymatiques, structurales ou régulatrices. Dans la section suivante, nous décrivons de manière succincte chacun des mécanismes essentiels à la division bactérienne et nous nous concentrerons ensuite sur certains aspects nécessaires à la compréhension du travail de thèse effectué.

### **i. Duplication et séparation de l'ADN**

La plupart des bactéries possède un seul ADN circulaire condensé sous la forme d'un chromosome ou nucléoïde, d'une taille comprise entre deux et quatre millions de paires de bases (Blattner et al., 1997). Dans les bactéries, la répllication de l'ADN est une réaction semi-conservative réalisée à une vitesse de 1000 paires de base par seconde et qui mène au dédoublement du chromosome (Reyes-Lamothe et al., 2008). Le temps nécessaire à la répllication totale du chromosome est estimé à 40 minutes chez *E. coli*, temps inférieur au

temps observé pour une division dans des conditions de culture riche. Ce phénomène s'explique par un chevauchement des cycles de réplication de l'ADN, permettant d'accélérer les cycles de division. La réplication est initiée sur un site précis du chromosome, appelé l'origine de réplication, et finit à la position opposée, appelée la région terminale.

L'étape d'initiation de la réplication requiert les protéines DnaA/DnaB(hélicase)/DnaC pour ouvrir la double hélice d'ADN et former une fourche de réplication (Magnan and Bates, 2015). Cette étape est suivie par l'arrivée d'autres protéines, telle que l'ADN polymérase III, menant à la formation d'un large complexe, le réplisome. Au cours de l'étape de réplication de l'ADN, chaque nucléotide présent sur les brins d'ADN séparés par DnaB sera dupliqué par le réplisome. Lorsque les fourches de réplication atteignent la région terminale, les protéines Tus se lient aux motifs «Ter » pour bloquer DnaB et ralentir la réplication jusqu'à ce que les deux fourches de réplication se rencontrent (Neylon et al., 2005). De nombreuses hypothèses existent concernant les mécanismes de séparation et de ségrégation des chromosomes, notamment parce que ceux-ci dépendent fortement de l'espèce bactérienne observée. Les deux hypothèses les plus couramment mises en avant sont 1) une séparation passive de l'ADN résultant de l'élongation des bactéries ou 2) une séparation active par des protéines motrices. La première hypothèse repose sur une séparation graduelle effectuée grâce à un attachement physique du chromosome à la membrane, permettant la séparation des chromosomes lors de la croissance la bactérie. La seconde hypothèse repose sur une séparation active et pourraient être médiées par la force produite par un système moteur de type ParA/B ou par l'action de l'ADN polymérase qui éloignerait les deux chromosomes l'un de l'autre (Toro and Shapiro, 2010).

## **ii. Synthèse du peptidoglycane et constriction de la membrane**

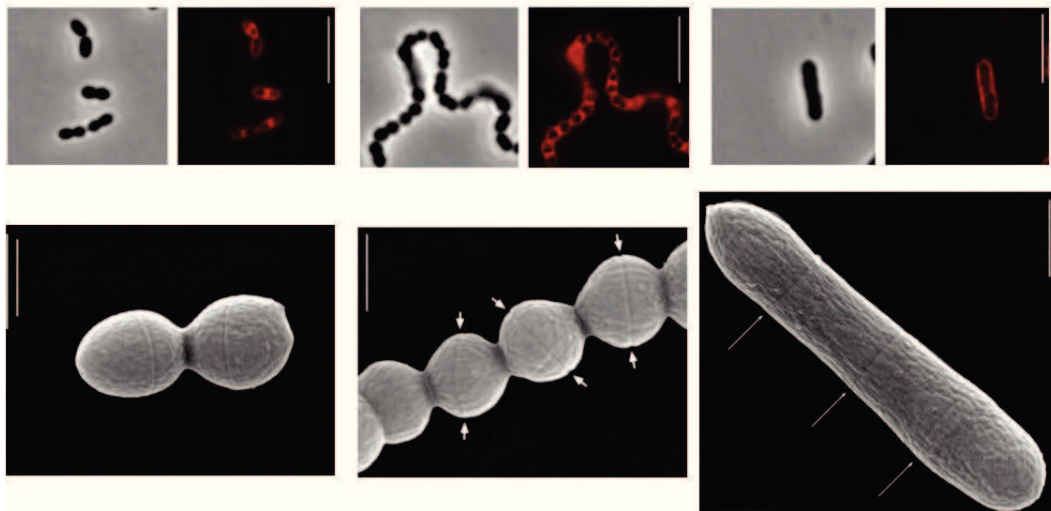
La composition et la synthèse du peptidoglycane chez le pneumocoque seront décrites en détail dans la section III.C. L'objectif de ce paragraphe-ci est de présenter succinctement les étapes du cycle cellulaire liées au peptidoglycane chez deux grandes familles morphologiques, les bacilles et les coques/ovocoques.

Le peptidoglycane (PG), composant essentiel de la paroi bactérienne, est un polymère constitué d'une partie glucidique et d'une partie peptidique. Il enveloppe la cellule bactérienne et lui confère sa forme et sa résistance à la pression osmotique. La synthèse du PG permet à la bactérie de s'allonger (processus d'**élongation**) et de se diviser (processus de

**division**). Elle résulte d'une cascade complexe de réactions enzymatiques prenant place dans le cytoplasme, puis à la surface de la bactérie. La synthèse du PG est réalisée par des macro-complexes protéiques, composés de protéines aux fonctions enzymatiques, structurales ou régulatrices, et échafaudés par des protéines du cytosquelette, MreB et FtsZ, qui sont respectivement des homologues de l'actine et de la tubuline eucaryotes.

Chez les bacilles, la synthèse de PG est effectuée en deux phases : l'élongation et la septation. L'élongation consiste en l'incorporation de nouveau PG sur toute la partie cylindrique du bacille, excepté aux pôles. Elle permet de doubler la quantité de PG et d'allonger la bactérie jusqu'au double de sa taille initiale. Le complexe protéique responsable de l'élongation est échafaudé par la protéine **MreB**. Au cours de la septation, qui correspond à la seconde phase du cycle cellulaire, la membrane plasmique s'invagine pour séparer le cytoplasme des deux cellules filles et une cloison de PG est synthétisée au centre de la bactérie. Le complexe protéique responsable de la septation est échafaudé par la protéine **FtsZ**.

Chez les ovocoques, le gène codant pour la protéine MreB est absent (Jones et al., 2001). Néanmoins, malgré l'absence de la protéine responsable de l'assemblage de la machinerie d'élongation, il existe **deux types de synthèse du PG**: l'un permet une élongation limitée de la bactérie et l'autre sa division, d'où leur forme ovoïde. Ces deux types de synthèse se font au site de division, au niveau duquel la protéine FtsZ recrute un très grand nombre des protéines de la division et de la synthèse du PG. Il est possible de mettre en évidence l'élongation ou la septation des ovocoques en perturbant la synthèse du PG par manipulation génétique ou par leur culture en présence d'antibiotiques. Ainsi, lorsque l'élongation ou la septation sont ralenties ou inhibées, les bactéries ont respectivement une forme plus ronde ou plus allongée (Fig. 5). Lors de la septation, la membrane s'invagine en même temps que le PG est synthétisé. Les mécanismes d'action de l'invagination de la membrane ne sont pas élucidés mais deux hypothèses non mutuellement exclusives sont privilégiées : une force constrictive via la polymérisation et dépolymérisation de la protéine FtsZ et/ou une force invaginatrice générée par la synthèse du PG. Ces hypothèses seront détaillées dans le paragraphe III.B.ii.



**Figure 5** : images de cellules sauvages de *S. pneumoniae* et de mutants  $\Delta stkP$  et  $\Delta stkP$ -PASTA (de gauche à droite). Les panneaux du haut montrent des images de microscopie en contraste de phase (images de gauche) et le marquage de la membrane au FM4-64 observé en microscopie à fluorescence (images de droite). Les panneaux du bas montrent des images de microscopie électronique à transmission. Barre d'échelle : 5  $\mu\text{m}$  (haut), 0,5  $\mu\text{m}$  (bas). D'après (Fleurie et al., 2014a)

### iii. Fermeture du septum et séparation des cellules filles

A la fin de la constriction, la fusion membranaire résulte probablement de la proximité des membranes. Après l'achèvement de la synthèse septale, une partie du PG septale est hydrolysée afin que les cellules filles se séparent. Cette action est réalisée par des hydrolases du PG dont l'activité doit être finement régulée dans le temps et dans l'espace afin de réaliser une hydrolyse limitée du PG et éviter une rupture de la paroi qui s'avèrerait fatale pour la bactérie.

Chez *E. coli*, cette hydrolyse ménagée est effectuée en même temps que l'invagination de la membrane et implique un nombre important d'hydrolases avec des activités enzymatiques redondantes, rendant leur étude très complexe (Burdett and Murray, 1974; Heidrich et al., 2001; Priyadarshini et al., 2007). Certaines bactéries à Gram positif, telles que *B. subtilis*, *S. aureus* ou *S. pneumoniae*, possèdent un nombre restreint d'hydrolases impliquées dans la séparation des cellules filles. Dans la majorité de ces espèces, le septum est synthétisé avant d'être clivé (Vollmer et al., 2008a). Chez *S. pneumoniae*, d'après la localisation des hydrolases du PG et la forme de la bactérie, la synthèse et le clivage du septum sont deux processus concomitants (Sham et al., 2011). Enfin chez *S. aureus*, la séparation des cellules filles serait due à une importante pression exercée au niveau du septum, résultant en une fracture mécanique qui se propage sur l'ensemble du septum en quelques millisecondes (Monteiro et al., 2015; Zhou et al., 2015).

## **B. Le cytosquelette bactérien**

### **i. Généralités**

Les travaux sur le cytosquelette eucaryote ont mené à des découvertes clefs concernant divers aspects fondamentaux du fonctionnement cellulaire, tels que la contraction musculaire, la forme des cellules, le transport intracellulaire, la division ou encore le mouvement des cellules. Après un résumé succinct des découvertes relatives au cytosquelette eucaryote, je présenterai les protéines du cytosquelette procaryote et plus particulièrement la protéine FtsZ chez le pneumocoque.

A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, les recherches sur la contraction musculaire permirent de découvrir le rôle de la myosine dans la contraction musculaire (Halliburton, 1887). La myosine fut extraite sous 2 formes : la myosine A, peu visqueuse, et la myosine B, très visqueuse. En 1942, les chercheurs hongrois Straub et Szent-Györgyi montrèrent que cette différence était due à la présence d'ATP et à l'actine, qu'ils nommèrent ainsi car ils pensaient que sa propriété était d'activer la fibre de myosine (pour revue, voir Szent-Györgyi, 2004). De très nombreuses études ont depuis montré les fonctions incroyablement variées de l'actine, élément cytosquelettique majeur de la cellule eucaryote. Une deuxième protéine du cytosquelette sera découverte en 1953 lorsque Shanya Inoue observa en microscopie optique la présence de fibres protéiques au sein des fuseaux mitotiques lors de la mitose (Inoué, 1953; Inoué and Sato, 1967). La protéine responsable de ces fibres fut identifiée en 1968 et elle fut appelée tubuline pour sa capacité à former des tubes protéiques (Weisenberg et al., 1968; Mohri, 1968).

Suite à ces découvertes et pendant des décennies, des structures similaires à celles du cytosquelette eucaryote ont été recherchées par microscopie chez les procaryotes. Il fallut attendre 1991 pour identifier l'homologue procaryote de la tubuline, FtsZ, comme étant responsable de la division bactérienne (Bi and Lutkenhaus, 1991). En 2001, c'est MreB, l'homologue de l'actine, qui sera identifiée comme étant responsable de l'élongation des bactéries (van den Ent et al., 2001; Jones et al., 2001).

## Protéines homologues de l'actine

En 1988, l'implication du gène *mreB* dans la morphogénèse d'*Escherichia coli* avait déjà été remarquée (Doi et al., 1988). Son homologie de séquence avec l'actine eucaryote avait été notée en 1992 (Bork et al., 1992) mais ce n'est qu'en 2001 que des similitudes fonctionnelles et structurales avec l'actine ont été montrées (van den Ent et al., 2001; Jones et al., 2001). La première étude de Van Den Ent montra que la protéine MreB1 de *Thermotoga maritima* polymérise *in vitro* sous la forme de filaments et revêt une conformation tridimensionnelle proche de celle de l'actine (van den Ent et al., 2001). D'autres études *in vivo* montrèrent le gène *mreB* est essentiel chez *B. subtilis* et que MreB est nécessaire à la morphogénèse des bacilles (Carballido-López, 2006; Daniel and Errington, 2003; Jones et al., 2001; Kawai et al., 2009). Pendant de nombreuses années, l'imagerie *in vivo* des protéines de type MreB ont suggéré qu'elles s'assemblaient sous la forme de structures hélicoïdales (Carballido-López et al., 2006). Plus récemment, il a été montré que la protéine MreB forme des amas protéiques qui effectuent des rotations autour de la périphérie cellulaire (Errington, 2015; Morgenstein et al., 2015)

Chez les bacilles, MreB est nécessaire à la synthèse de paroi qui leur permet de s'allonger, appelée la synthèse d'élongation. De ce fait, il n'est pas étonnant que MreB, ainsi que tous les gènes nécessaires à l'élongation, soient absents des génomes des coques tels que *Staphylococcus aureus* qui ont une forme sphérique. En revanche, MreB n'est pas non plus retrouvée dans le génome des ovocoques tels que *S. pneumoniae*, qui ont pourtant une forme légèrement allongée et qui possèdent la majorité des protéines impliquées dans la synthèse de peptidoglycane liée à l'élongation. Ces protéines (PBP2b, RodA, MreC, MreD) sont localisées au septum et leur localisation est dépendantes de FtsZ (Philippe et al., 2014). Ces données peuvent être corrélées à deux observations chez *E. coli* : 1) lorsque MreB est inhibée, FtsZ la remplace partiellement pour la synthèse d'élongation (Varma and Young, 2009) et 2) peu avant l'initiation de la synthèse de paroi septale, les protéines de l'élongation co-localisent avec FtsZ pour synthétiser de la paroi en périphérie du septum (de Pedro et al., 1997; van der Ploeg et al., 2013). Ces deux observations supportent l'idée que chez les ovocoques comme chez les bacilles, l'insertion de peptidoglycane non septal peut être dirigée par la protéine FtsZ.

## Protéines homologues à la tubuline

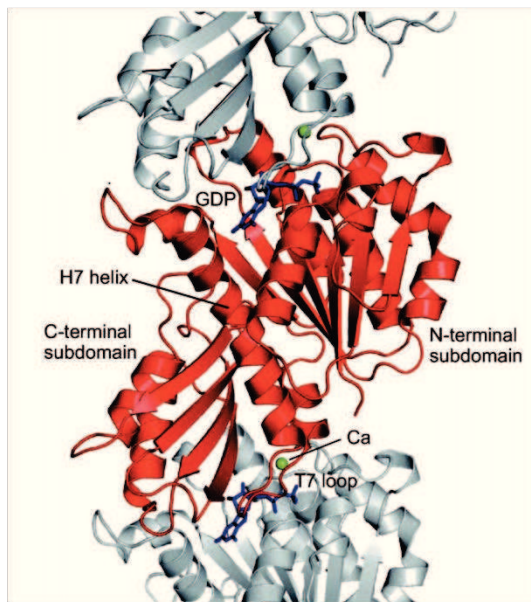
Aujourd'hui, environ une demi-douzaine de protéines ayant des similarités avec la tubuline ont été identifiées et sont considérées comme éléments du cytosquelette bactérien. La plus connue est FtsZ, protéine majeure de la division bactérienne. Les autres homologues de la tubuline ont été bien moins caractérisés. Parmi ces protéines, on trouve chez les bactéries du genre *Prostheco bacter* les protéines BtubA et BtubB qui possèdent une plus forte homologie de séquence avec la tubuline eucaryotique (environ 35%) qu'avec FtsZ (moins de 17%) (Jenkins et al., 2002). Cette homologie est par ailleurs supportée par le fait que ces protéines s'assemblent en un hétérodimère ressemblant à l'hétérodimère formé par la tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  (Schlieper et al., 2005). La fonction de ces protéines reste pour le moment inconnue. Une autre protéine a été caractérisée comme étant un hybride entre la tubuline et FtsZ, ce qui lui a valu son nom de TubZ. (Aylett et al., 2010; Larsen et al., 2007). Le gène *tubZ* est présent sur les plasmides de nombreuses espèces du genre *Bacillus* et pourrait être impliqué dans la réplication de ces plasmides (Tinsley and Khan, 2006). En effet, il a été montré que TubZ a la capacité de polymériser pour permettre la séparation des plasmides lors de la division cellulaire (Akhtar et al., 2009; Chen and Erickson, 2008; Tinsley and Khan, 2006).

### ii. FtsZ

La région du génome d'*E. coli* contrôlant la division cellulaire a été identifiée pour la première fois par sélection de mutants qui présentaient une morphologie filamenteuse, révélatrice d'un défaut de division, lorsqu'ils étaient placés dans des conditions de température élevée (Allen et al., 1974; Van De Putte et al., 1964). Les gènes situés dans cette partie du génome furent appelés « filamentous temperature sensitive » ou « fts » suivis d'une lettre pour les différencier. Initialement, *ftsZ* ne fut pas décrit dans la littérature et sa séquence fut par erreur accolée au gène *ftsA*. Des études complémentaires ont permis de montrer la présence des deux séquences codantes et proposèrent de nommer le second gène *ftsZ* (Lutkenhaus et al., 1980). En 1985, Begg et Donachie montrèrent que la plupart des mutants *fts* étaient incapables d'accomplir une division cellulaire complète mais qu'ils présentaient tous un début de septation visible, excepté pour les mutants *ftsZ* qui ne présentaient aucun signe de septation (Begg and Donachie, 1985). Cette observation a révélé pour la première fois le rôle précoce joué par FtsZ dans la division cellulaire et la synthèse de paroi septale. Il fut montré plus tard que la présence de FtsZ est nécessaire au positionnement des protéines de

synthèse de la paroi ; son rôle majeur dans l'organisation de la division bactérienne a ainsi été mis à jour. FtsZ est présente et essentielle chez la quasi-totalité des bactéries excepté chez quelques espèces dont les plus connues sont les espèces du genre *Chlamydia* (pour revue, voir Erickson and Osawa, 2010).

L'identité de séquence entre les orthologues de FtsZ est élevée, elle est supérieure à 50% entre les espèces *S. pneumoniae*, *B. subtilis*, *E. coli* et *S. aureus*. Entre la protéine FtsZ et les isoformes de tubuline, l'identité de séquence ne dépasse généralement pas 10% (Mukherjee and Lutkenhaus, 1994) mais la structure tertiaire de ces protéines présente une forte homologie (Löwe and Amos, 1998; Nogales et al., 1998, 1998).



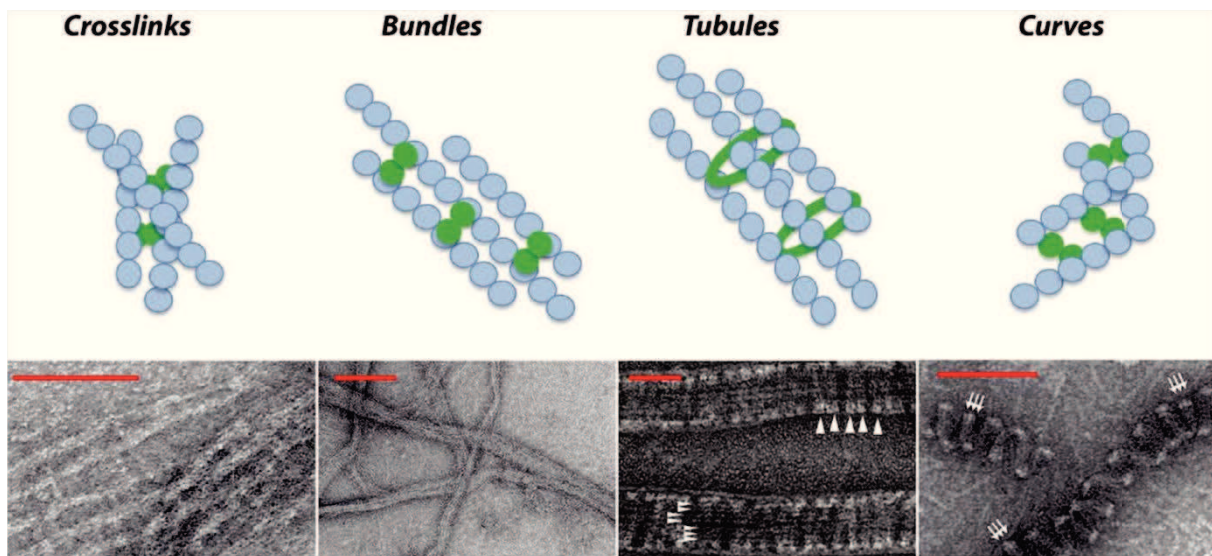
**Figure 6** : Structure de FtsZ dans sa forme liée au GDP chez *S. aureus*. Représentation en ruban de l'oligomère de FtsZ présent dans les cristaux. Le GDP est représenté en bâtonnets bleus. A l'extrémité de l'hélice H7, la boucle T7 qui stabilise la liaison du GDP dans le site actif d'une molécule adjacente en présence d'une molécule  $Ca^{2+}$  est annotée. D'après Matsui et al., 2012.

Comme la tubuline, FtsZ lie le GTP via un motif de fixation de type « GGGTGS/TG » (de Boer et al., 1992). Chez la tubuline toutefois, le nucléotide se fixe dans une cavité hydrophobe située au cœur de la protéine alors que chez FtsZ, le GTP se fixe dans une cavité hydrophile présente à la surface de la protéine (Löwe and Amos, 1998; Nogales et al., 1998, 1998). Par ailleurs chez FtsZ, la liaison du GTP dans le site actif d'un monomère est stabilisée par l'interaction avec la boucle T7 du monomère adjacent (Fig. 6). L'activité GTPase est également différente entre les deux protéines. En effet, alors que la polymérisation de FtsZ est dépendante de la liaison au GTP, la polymérisation de la tubuline est dépendante de l'hydrolyse du GTP en GDP. Dans le cas de FtsZ, l'hydrolyse du GTP en GDP provoque non seulement la courbure des filaments de FtsZ, mais entraîne également leur dépolymérisation (Chen and Erickson, 2005; Mukherjee and Lutkenhaus, 1994; Li et al, 2013).



## 1. Polymérisation de FtsZ *in vitro*

L'observation de FtsZ *in vitro*, par microscopie électronique, révèle sa capacité à polymériser en présence de GTP (Bramhill and Thompson, 1994; Erickson et al., 1996; Mukherjee and Lutkenhaus, 1994). *In vitro*, les protofilaments de FtsZ peuvent également s'associer entre eux pour former des structures de formes différentes, telles que des filaments chevauchants, des rubans, des tubes ou des hélices. Ces associations sont dépendantes des conditions de polymérisation et de la présence de partenaires protéiques de FtsZ (Fig. 7). Il n'est pas aujourd'hui démontré si ces structures sont physiologiquement pertinentes.

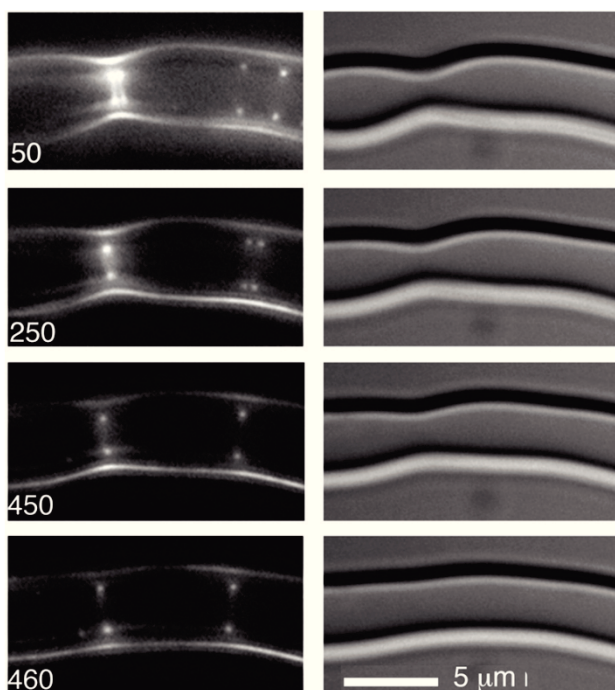


**Figure 7** : Diagramme (haut) et images de microscopie électronique (bas) des différentes structures adoptées *in vitro* par des polymères de FtsZ en présence de protéines partenaires de FtsZ. Dans les diagrammes, les molécules de FtsZ sont colorées en bleu et les partenaires en vert. De gauche à droite : structures adoptées par les filaments de FtsZ en présence de ZapA de *E. coli* (Mohammadi et al., 2009); de ZapD de *E. coli* (Durand-Heredia et al., 2012); de SepF de *B. subtilis* (Gündoğdu et al., 2011); de FzIA de *C. crescentus* (Goley et al., 2010). Barres d'échelle de gauche à droite : 100 nm, 200 nm, 50 nm, and 100 nm. D'après Huang et al., 2013.

## 2. Structure de l'anneau Z *in vivo*

Suite à une étude de microscopie électronique qui visait à observer la localisation de FtsZ dans des cellules, Bi et Lutkenhaus suggérèrent en 1991 que les molécules de FtsZ s'auto-assemblent sous la forme d'une structure annulaire qui fut nommée « anneau Z » (« FtsZ-ring ou Z-ring ») (Addinall et al., 1996; Bi and Lutkenhaus, 1991; Ma et al., 1996). Par la suite, il a été montré que cette structure annulaire est composée de protofilaments qui auraient deux fonctions : 1) échafauder l'assemblage du complexe de synthèse de la paroi et 2) générer une force constrictive sur la membrane, nécessaire à la division (de Boer et al., 1992; Harry et al., 2006).

L'anneau Z est une structure très dynamique et les molécules de FtsZ dans l'anneau sont très rapidement échangées avec les molécules de FtsZ présentes dans le cytoplasmique. Selon les espèces, la quantité de FtsZ par cellule est estimée entre 3000 et 15 000 molécules (Dai and Lutkenhaus, 1992; Lara et al., 2004; Rueda et al., 2003), dont seulement 30% seraient présentes dans l'anneau chez *E. coli* (Stricker et al., 2002). Des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) chez les bacilles ont montré qu'un retour de fluorescence est observé 9 à 30 secondes après photoblanchiment d'une portion de l'anneau Z (marqué à l'aide d'un fluorophore) (Anderson et al., 2004; Stricker et al., 2002). Cette durée est comparable à la dynamique d'assemblage des protofilaments de FtsZ, étudié *in vitro* par FRET, qui est d'environ 7 secondes (Chen and Erickson, 2005). En microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy, AFM), des fragmentations et des ré-hybridations ont été observées entre les filaments de FtsZ, suggérant qu'un échange de molécules puisse également se faire au niveau de sites internes dans les polymères de FtsZ (Mingorance et al., 2005). Le caractère dynamique de l'assemblage de l'anneau Z a également récemment été observé chez *B. subtilis* et *S. aureus* par 3D-SIM (three-dimensional Structured Illumination Microscopy). Cette technique de microscopie super-résolue a montré la redistribution très rapide de molécules de FtsZ fusionnées à la GFP au sein de l'anneau Z (Strauss et al., 2012).



**Figure 8** : Constriction d'un tubule de liposome par FtsZ. Les images de gauche montrent la fluorescence d'une protéine de fusion FtsZ-YFP ancrée à la membrane et les images de droite montrent le liposome en DIC (Differential Interference Contrast). Les images montrent une apparente constriction du tubule au niveau du signal fluorescent (t=50 et 250 sec); cette constriction se relâche par la suite (t=450 et 460 sec). Barre d'échelle :5 µm. D'après (Osawa et al., 2008).

Un rôle majeur de FtsZ serait de générer la force nécessaire à la constriction de la membrane cytoplasmique, hypothèse supportée par le fait que FtsZ est suffisante pour provoquer la constriction de liposomes *in vitro* en présence de GTP (Fig. 8) (Osawa et al., 2008, 2009, 2011). Un premier

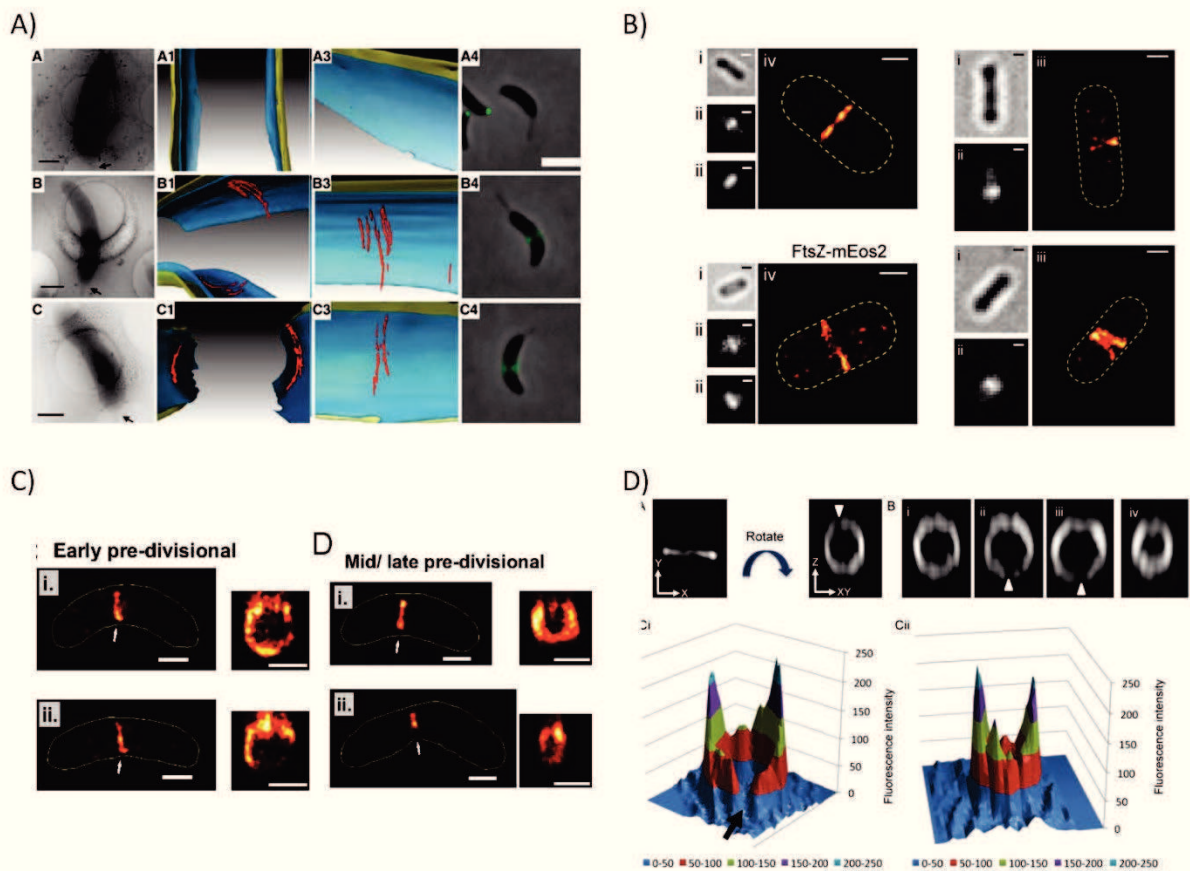
modèle propose que l'anneau Z soit continu et que sa constriction résulte du glissement des filaments de FtsZ les uns contre les autres (mécanisme de « sliding ») (Bramhill, 1997). Ce modèle est basé sur l'observation de filaments de FtsZ continus et juxtaposés dans des

cellules ou des liposomes observés en tomographie cryo-électronique (ECT ou Electro cryo-tomography) (Szwedziak et al., 2014).

Toutefois, ce modèle est en contradiction avec une autre étude en ECT réalisée chez *C. crescentus* et qui a montré la présence de plusieurs protofilaments de FtsZ au niveau du site de division mais n'a pas détecté de contact physiques entre ces filaments (Fig. 9.A) (Li et al., 2007). Par ailleurs, les récentes études de l'anneau Z en microscopie super-résolue suggèrent toutes une discontinuité de l'anneau. Trois études en PALM (PhotoActivated Localization Microscopy), qui ont permis d'imager à très haute résolution (20-40 nm) des molécules de FtsZ fusionnées à des protéines fluorescentes dans des cellules d'*E. coli* et de *C. crescentus*, ont révélé une structure annulaire hétérogène, présentant des zones de forte densité de fluorescence alternant avec des zones dépourvues de signal fluorescent (Fig. 9.B-C) (Fu et al., 2010; Biteen et al., 2012; Holden et al., 2014). Cet aspect granulaire et hétérogène de l'anneau Z a été également observé en STED (microscopie à déplétion par émission stimulée) et en 3D-SIM chez *B. subtilis* et *S. aureus* (Fig. 9.D) (Jennings et al., 2011; Strauss et al., 2012). Une étude utilisant la polarisation de la fluorescence a par ailleurs montré que les protofilaments de FtsZ sont organisés de façon désordonnée chez *B. subtilis* et *E. coli* (Si et al., 2013). Toutes ces observations suggèrent un modèle dans lequel les filaments de FtsZ s'assembleraient de façon désordonnée pour former des amas (« clusters ») au niveau du site de division. L'anneau Z ne serait donc pas la structure homogène et continue qui avait initialement été observée en microscopie à fluorescence conventionnelle mais une structure en collier de perles potentiellement discontinue (Fig. 9). L'acquisition d'images en 3D-SIM au cours du cycle cellulaire a par ailleurs montré que la position des zones de forte densité de fluorescence varie dans le temps, suggérant un possible mouvement des grappes de FtsZ au sein de l'anneau, ou une dynamique d'assemblage et désassemblage des grappes très rapide (Strauss et al., 2012).

Dans un nouveau modèle intégrant ces données, la constriction de la membrane ne proviendrait pas du mouvement des filaments de FtsZ les uns contre les autres mais de la courbure des filaments de FtsZ engendrée par l'hydrolyse du GTP en GDP, couplée aux cycles de polymérisation et dépolymérisation des filaments de FtsZ. D'après des modélisations théoriques, la force de courbure des filaments de FtsZ serait suffisante pour permettre la constriction de la membrane (Hsin et al., 2012; Li et al., 2013). Une autre source d'énergie pourrait provenir de la pression exercée par la synthèse de la paroi septale, qui

pousserait la membrane de façon centripète. La conjugaison des deux forces de poussée et de traction permettrait l'invagination et la constriction de la membrane (Meier and Goley, 2014).



**Figure 9** : L'anneau Z imagé à haute résolution. *A*) Images de cryo-tomographie avec une vue 3D du site de division ((A1–C1) et (A3–C3), barres d'échelle : 500 nm. ) et de microscopie à fluorescence (A4–C4, barres d'échelle : 2  $\mu$ m) des premières étapes du cycle cellulaire de *C. crescentus*. Les molécules de FtsZ sont colorées en rouge sur la reconstruction 3D. Modifié de (Li et al., 2007) *B*) Images de microscopie super-résolue PALM de cellules d'*E. coli* exprimant la protéine de fusion FtsZ-mEos2. En l'absence de constriction, les anneaux de FtsZ apparaissent sous la forme de structures pouvant s'apparenter à des hélices (B, droite), qui disparaissent lorsque la cellule commence à se contracter (B, gauche). Images en lumière transmise (i), limitée en diffraction (ii) et reconstruction PALM (iii.) Barres d'échelle : 500 nm. D'après (Fu et al., 2010) *C*) Images PALM de cellules de *C. crescentus* exprimant la protéine de fusion FtsZ-Dendra2 avant (gauche) et pendant la constriction (droite). La gamme de couleurs du blanc vers le rouge traduit la densité de molécules dans l'ordre décroissant. Barres d'échelle : 500 nm. D'après (Holden et al., 2014). *D*) Images en 3D-SIM de l'anneau Z chez *B. subtilis*, montrant des variations d'intensité de fluorescence au cours du temps. Dans les panneaux inférieurs, ces images sont analysées sous la forme de graphes tridimensionnels montrant la distribution hétérogène de l'intensité de fluorescence au sein de l'anneau. D'après (Strauss et al., 2012).

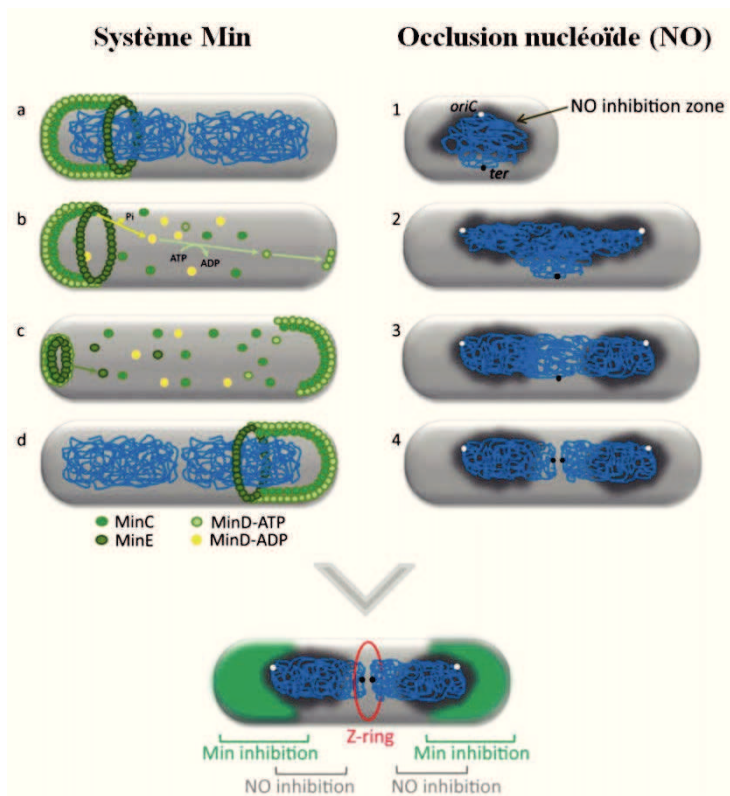
Note: des structures hélicales formées par FtsZ ont été observées au cours de la sporulation chez *B. subtilis* lorsque FtsZ se relocalise au site de division asymétrique. Des structures similaires ont aussi parfois été observées en microscopie à fluorescence conventionnelle (Ben-Yehuda and Losick, 2002) et en PALM (Fu et al., 2010) dans des cellules pré-divisionnelles d'*E. coli*. Ces observations suggèrent que l'anneau Z pourrait résulter de la compression d'une structure hélicale. Ces structures n'ont jamais été observées dans des cellules en cours de constriction, laissant penser que l'hélice pourrait se condenser au cours de cette phase (Fig.

9.B). Il a également été proposé que ces hélices puissent être une forme de stockage des polymères de FtsZ, nécessitant une moindre énergie que la dépolymérisation des protofilaments. Chez les coques et les ovocoques, ces hélices ne sont pas observées en conditions physiologiques mais peuvent apparaître dans des souches mutantes présentant des défauts de division (Land et al., 2013; Morlot et al., 2003; Strauss et al., 2012; Fleurie et al., 2014). De plus, il a été montré que l'ajout d'une étiquette fluorescente attachée à la protéine FtsZ et que la sur-expression de FtsZ induisent la formation de structures hélicales (Fu et al., 2010; Margolin, 2012). Il est donc fort probable que malgré une forte propension de FtsZ à former des hélices, ces structures n'existent pas en conditions physiologiques lors de la croissance végétative.

### 3. Système de positionnement de l'anneau Z

La division cellulaire est un processus très précis au cours duquel la septation s'effectue au centre de la bactérie, avec une déviation de positionnement inférieure à 1-2% chez *E. coli* et *B. subtilis* (Migocki et al., 2002; Trueba, 1982). FtsZ étant responsable de la synthèse de paroi septale, sa localisation doit être très finement régulée.

Chez les bacilles, la localisation au centre de la bactérie est guidée principalement par deux processus concomitants de sélection négative : le système d'occlusion par le nucléoïde et le système Min (Fig. 10).



**Figure 10 :** Régulation spatiale et temporelle de l'assemblage de l'anneau Z par les systèmes Min et l'occlusion par le nucléoïde chez *E. coli* et *B. subtilis*. Le système Min empêche la polymérisation de FtsZ grâce aux protéines Min C, MinD et MinE. L'occlusion par le nucléoïde empêche la formation de l'anneau dans la région occupée par l'ADN. Pour détails, voir texte. D'après (Veiga and Pinho, 2013)

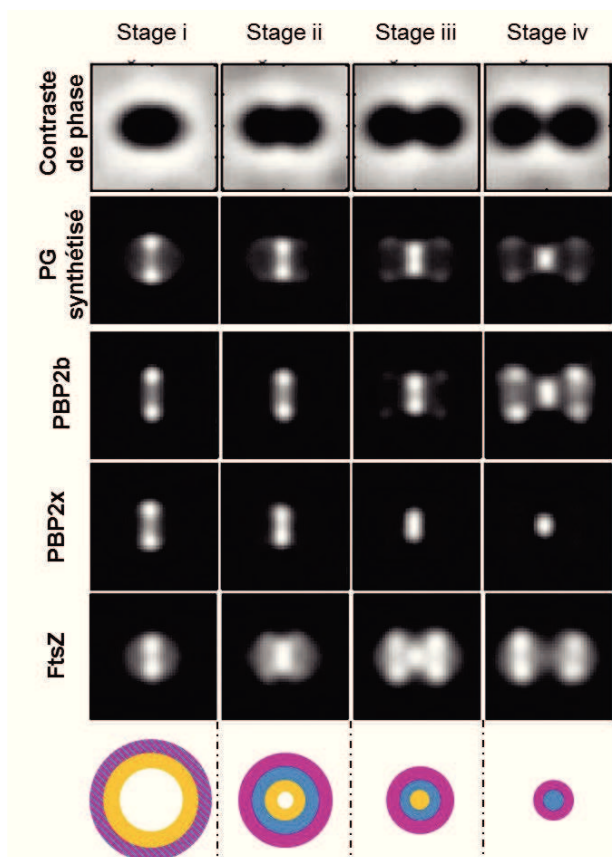
Le premier système implique deux protéines, Noc (*B. subtilis*) (Wu and Errington, 2004) et SlmA (*E. coli*) (Bernhardt and de Boer, 2005), qui lient l'ADN et empêchent la formation de l'anneau Z dans la région occupée par le nucléoïde (Fig. 10). En se liant à une séquence nucléique spécifique (SlmA-binding sequence), SlmA va bloquer la formation de l'anneau Z par un mécanisme encore non élucidé mais qui implique une interaction directe avec FtsZ (Cho and Bernhardt, 2013; Du and Lutkenhaus, 2014; Tonthat et al., 2013). Comme SlmA, la protéine Noc se lie sur une séquence spécifique de l'ADN mais n'interagit pas avec FtsZ pour bloquer la division (Wu et al., 2009). En recrutant le nucléoïde à la membrane via son domaine membranaire, Noc crée un encombrement stérique dû à la présence d'ADN, de multimères de Noc et des complexes de transcription et de traduction de l'ADN (Adams et al., 2015; Mulder and Woldringh, 1989). Cet encombrement inhiberait la formation de l'anneau Z et/ou son recrutement à la membrane via ses partenaires membranaires (FtsA, ZipA, SepF).

Dans le système Min, la forme dimérique de la protéine membranaire MinD se lie à MinC, qui inhibe la polymérisation de FtsZ (Hu et al., 1999; Zhou and Lutkenhaus, 2005; Shen and Lutkenhaus, 2009). Le positionnement du complexe MinCD est régulé par une protéine présente uniquement chez les bactéries à Gram négatif, la protéine MinE. MinE déstabilise le dimère de MinD, obligeant la protéine à se ré-assembler dans une autre région de la cellule (Fig. 10). MinC, MinD et MinE vont ainsi osciller d'un pôle à l'autre de la cellule pour inhiber la polymérisation de FtsZ dans ces régions polaires. Chez *B. subtilis*, MinE n'est pas présente et, en conséquent, MinC et MinD n'oscillent pas dans la cellule. MinC et MinD sont présentes dans les régions polaires de la cellule, au niveau desquelles elles ont recrutées par la protéine MinJ, elle-même recruté par la protéine DivIVA, une protéine présente aux pôles de la cellule à la fin du cycle cellulaire (Bramkamp et al., 2008; Eswaramoorthy et al., 2011; Patrick and Kearns, 2008). Chez les coques tel que *S. aureus*, dont le plan de division change à chaque cycle, le système de positionnement reste énigmatique. Chez les ovocoques, un nouveau mécanisme de positionnement de l'anneau Z a récemment été découvert et il sera discuté dans le sous-paragraphe suivant.

#### 4. FtsZ chez *Streptococcus pneumoniae*

A la différence de la plupart des bactéries modèles, les gènes de la division chez *S. pneumoniae* ne sont pas regroupés au sein d'une région unique mais répartis entre trois îlots éloignés sur le chromosome (Massidda et al., 1998). Le gène *ftsZ* est présent dans l'îlot comprenant également *ftsA*, *ylmE*, *sepF*, *ylmG*, *ylmH* et *divIVA*. Le nombre de molécules de FtsZ est estimé à 3000 par cellule (Lara et al., 2004).

##### a. Localisation et dynamique de l'anneau Z chez le pneumocoque



**Figure 11** : Reconstitution des étapes du cycle cellulaire de *S. pneumoniae* à partir d'une moyenne d'images de contraste de phase ou de fluorescence. La localisation des PBP (PBP2b et PBP2x, enzymes de synthèse du PG respectivement spécifiques de l'élongation et de la division) et de FtsZ a été analysée par immunofluorescence. Les régions de néo-synthèse du PG ont été marquées par de la vancomycine fluorescente. Dans les cellules pré-divisionnelles (stade i), FtsZ et les PBP sont localisées au centre de la bactérie et forment une structure annulaire visualisée sur la tranche. Une synthèse active de PG est déjà visible à cette étape. Dans les cellules en cours de constriction (stade ii), le diamètre des structures annulaires diminue, celui de FtsZ étant inférieur à celui de la PBP de la division (PBP2x), lui-même inférieur à celui de la PBP de l'élongation (PBP2b). En fin de constriction (stade iii), FtsZ quitte le site de division parental pour s'assembler aux sites de division des futures cellules filles. Dans la dernière étape (stade iv), FtsZ n'est plus présente au site de division parental alors que les PBP y sont toujours présentes pour achever la synthèse du PG septal. Les PBP commencent à apparaître aux sites de division des futures cellules filles. Sous les images, un schéma d'une section du site de division dans le plan axial montre le profil de localisation des protéines de l'élongation (rose), de la division (bleu) et de FtsZ (jaune). D'après (Land et al., 2013).

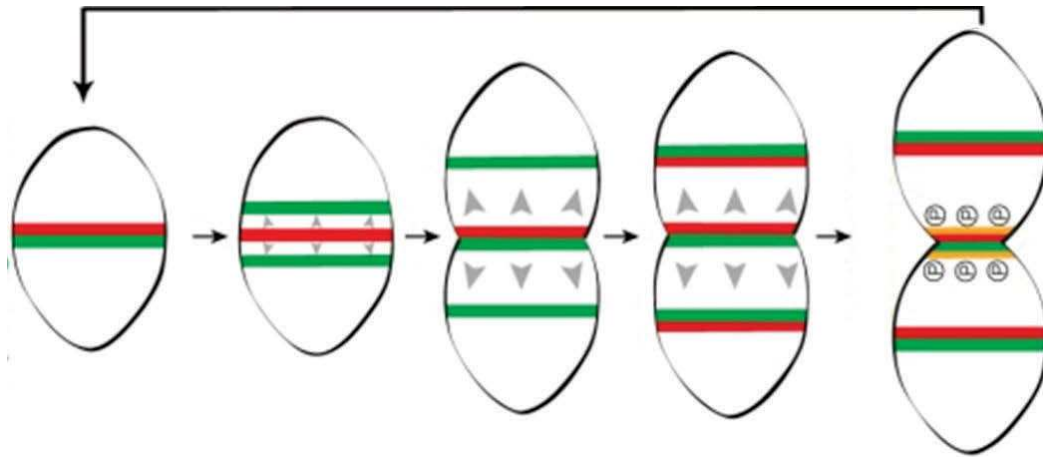
Comme chez toutes les bactéries, l'anneau Z chez *S. pneumoniae* apparaît comme une structure continue et homogène lorsqu'il est observé en microscopie à fluorescence conventionnelle (Morlot et al., 2003). FtsZ est recrutée de façon précoce au site de division du pneumocoque mais sa constriction ne débute qu'environ au tiers du cycle cellulaire (qui dure 30 à 40 min) (Fig. 11). Sa relocalisation aux futurs sites de division des cellules filles intervient avant la fin de la division de la cellule mère. FtsZ est la seule protéine du

cytosquelette chez le pneumocoque et il a été montré qu'elle recrute l'ensemble des protéines de synthèse de la paroi, à la fois celles nécessaires à l'élongation et celles nécessaires à la septation (Fleurie et al., 2014a). Les structures annulaires formées par les protéines de synthèse de la paroi présentent toutefois toutes un retard de constriction comparée à celle de l'anneau Z, suggérant un découplage spatial entre les machineries de constriction de la membrane, de la synthèse de PG dédiée à l'élongation et de la synthèse de PG dédiée à la septation au cours du cycle cellulaire (Fig. 11) (Land et al., 2013; Morlot et al., 2003; Tsui et al., 2014).

Chez le pneumocoque, il n'existe pas de système Min et de système Noc. En revanche, l'équipe de C. Grangeasse, puis plus tard l'équipe de P. Branny, a récemment découvert qu'une protéine nommée MapZ (Mid-cell Anchored protein Z) est impliquée dans le positionnement et l'assemblage de l'anneau Z au site de division à travers un mécanisme de sélection positive (Fleurie et al., 2014b; Holečková et al., 2015). MapZ possède un domaine cytoplasmique dont la région N-terminale (les 41 premiers acides aminés) interagit avec FtsZ avec une affinité d'environ 9 nM. Ce domaine est par ailleurs phosphorylé par la Ser/Thr kinase StkP qui est un régulateur majeur de la division chez *S. pneumoniae* (voir le sous-paragraphe III.B.ii.4). En aval de ce domaine cytoplasmique, MapZ possède un segment transmembranaire ainsi qu'un domaine extracellulaire qui se lie au PG (Fleurie et al., 2014b). Au début du cycle cellulaire, l'apparition d'un anneau de MapZ au site de division précède l'apparition de l'anneau Z (Fleurie et al., 2014b; Holečková et al., 2015). L'anneau unique de MapZ va ensuite se dédoubler en deux anneaux qui se localisent aux futurs sites de division des cellules filles et qui s'éloignent progressivement au fur et à mesure que la paroi est synthétisée en périphérie du septum parental (élongation) (Fig. 12). Après dédoublement de l'anneau initial de MapZ, un troisième anneau apparaît au site de division de la cellule mère. Comme pour les enzymes de synthèse de la paroi, sa constriction est retardée par rapport à celle de l'anneau Z. Les domaines extracellulaire et cytoplasmique, ainsi que les sites de phosphorylation portés par ce dernier, sont importants pour la localisation de MapZ. En absence de MapZ ou lorsque MapZ est délocalisée, l'anneau Z présente des défauts de positionnement et de structure, ce qui engendre des défauts de division et de forme cellulaire (Fleurie et al., 2014b). L'ensemble de ces observations suggère un modèle dans lequel le domaine cytoplasmique de MapZ recruterait FtsZ au site de division du pneumocoque, MapZ se dédoublerait ensuite en deux anneaux qui marqueraient la position des futurs sites de division des cellules filles grâce à l'interaction du domaine extracellulaire de MapZ avec la



paroi, supposée de composition particulière sur ces sites. La fonction du troisième anneau MapZ reste inconnue mais elle pourrait être nécessaire à la constriction de FtsZ (Fig. 12) (Fleurie et al., 2014b).



**Figure 12** : Modèle du positionnement de FtsZ médié par MapZ chez *S. pneumoniae*. MapZ est symbolisée en vert et FtsZ en rouge. La phosphorylation de MapZ (symbole P) lors de la constriction pourrait réguler la constriction de l'anneau FtsZ lors de la dernière étape du cycle cellulaire. D'après (Fleurie et al., 2014b).

### b. Protéines en interaction directe avec l'anneau Z chez *S. pneumoniae*

Nom	gène (R6)	Référence Uniprot	Taille (a.a)	Topologie	Localisation	Fonction
FtsZ	spr1510	<a href="#">Q8DNV9</a>	419	Cytoplasmique	septale	Recrutement de protéines de la division au septum, constriction de la membrane
MapZ*	spr0334	<a href="#">Q8DR55</a>	464	Bitopique : domaine cytoplasmique, segment transmembranaire (a.a : 159-179) et domaine extracellulaire	septale	Positionnement de l'anneau Z, régulation de la structure de l'anneau Z
FtsA	spr1511	<a href="#">Q8DNV8</a>	457	Cytoplasmique, hélice amphipathique liant la membrane (a.a : 442-457)	septale	Ancrage membranaire de l'anneau Z, stabilisation de l'anneau Z, recrutement de protéines de la division au septum
SepF	spr1508	<a href="#">Q8DNW1</a>	179	Cytoplasmique, hélice amphipathique liant la membrane (a.a : 1-10*)	septale	Ancrage de FtsZ à la membrane, stabilisation de l'anneau Z
EzrA*	spr0716	<a href="#">Q8DOE5</a>	575	Cytoplasmique, segment transmembranaire (a.a : 9-27)	septale	Régulation négative de l'assemblage de l'anneau Z, coordination de la synthèse de paroi pour l'élongation et la septation
ZapA	spr0366	<a href="#">Q8CZ65</a>	103	Cytoplasmique	septale	Régulation positive de l'assemblage de l'anneau Z
ZapB	spr0367	<a href="#">Q8DR27</a>	182	Membranaire (3 segments transmembranaires)	septale	Régulation positive de l'assemblage de l'anneau Z
FtsK	spr0781	<a href="#">P64167</a>	767	Membranaire (5 segments transmembranaires)	septale	Résolution des chromosomes au septum
DivIVA	spr1505	<a href="#">Q8CWP9</a>	262	Cytoplasmique	septale et polaire	Coordination de la synthèse de paroi pour l'élongation et la septation, nécessaire à la séparation des cellules
StkP	spr1577	<a href="#">Q8DNS0</a>	659	Bitopique : domaine cytoplasmique, segment transmembranaire (a.a : 343-363) et domaine extracellulaire	septale	Serine/threonine kinase qui phosphoryle FtsA, FtsZ, MapZ et DivIVA, coordination de la synthèse de paroi pour l'élongation et la septation,
PhpP	spr1578	<a href="#">Q8DNR9</a>	246	Cytoplasmique	Septale et cytoplasmique	Phosphatase; régulation de la division cellulaire
ClpX	spr1427	<a href="#">P63792</a>	410	Cytoplasmique	N.D.	Protéine du complexe du protéasome ClpXP, séquestre/dégrade FtsZ

**Tableau 1 : FtsZ et ses partenaires chez *S. pneumoniae*. (N.D. : non déterminée ; a.a. : acides aminés). Voir texte pour détails. \* Protéines pour lesquelles une interaction physique directe avec FtsZ a été démontrée chez *S. pneumoniae*.**

## MapZ

Le rôle de MapZ dans la localisation de FtsZ a été décrit dans le paragraphe précédent. Cette protéine est retrouvée dans la majorité de l'ordre des *Lactobacillales* et dans toutes les espèces de la famille des *Streptococcaceae*. MapZ est une protéine transmembranaire découverte dans le phosphoprotéome de la kinase StkP (Beilharz et al., 2012), se liant à la fois au PG et à FtsZ. A ce jour, le système MapZ représente le seul mécanisme connu de positionnement positif de l'anneau Z chez les bactéries.

## FtsA

Le gène *ftsA* est localisé en amont du gène *ftsZ* et code pour une protéine hautement conservée de 50 kDa, appartenant à la famille de l'actine et de HSP70 (Bork et al., 1992; Szwedziak et al., 2012). Cette protéine cytoplasmique possède une hélice C-terminale amphipatique lui permettant de se lier à la membrane (Pichoff and Lutkenhaus, 2005). FtsA se lie au domaine C-terminal de FtsZ et ancre ainsi FtsZ à la membrane. Comme l'actine et ses homologues bactériens, elle est capable de former des protofilaments *in vitro* (Lara et al., 2004; Szwedziak et al., 2012). FtsA se localise au site de division et est présente au nombre de 2200 molécules par cellule chez *S. pneumoniae* (contre 3000 pour FtsZ) (Lara et al., 2004). Il a été montré chez *E. coli* et *B. subtilis* qu'un ratio d'une molécule de FtsA pour 5 molécules de FtsZ était requis pour effectuer la division cellulaire (Rueda et al., 2003). Chez le pneumocoque, ce ratio est de 1:1.5 (FtsA:FtsZ) (Lara et al., 2004).

## SepF (*ylmF*)

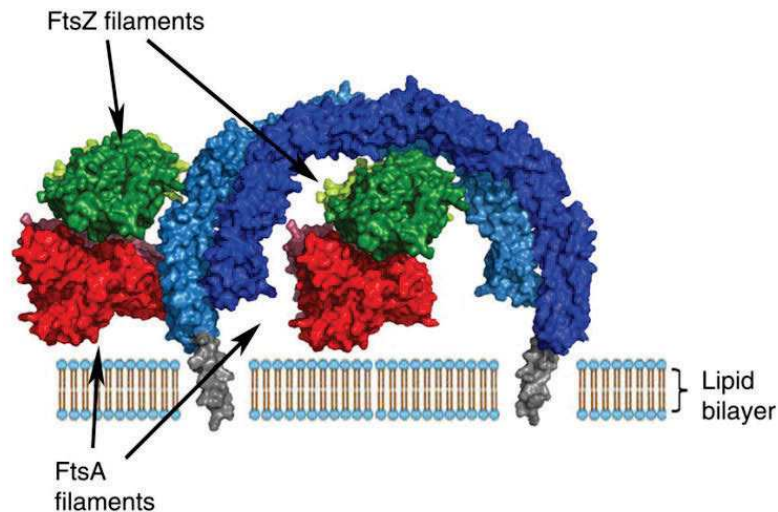
Le gène *ylmF*, codant pour la protéine SepF, est localisé dans l'îlot génomique de division contenant *ftsA*, *ftsZ* et *divIVA* chez le pneumocoque (Fadda et al., 2003). Cette protéine fut découverte chez *B. subtilis* par deux groupes indépendants et elle est conservée chez les bactéries à Gram positif et les cyanobactéries (Hamoen et al., 2006; Ishikawa et al., 2006). Chez *B. subtilis*, SepF interagit avec les 16 derniers acides aminés de FtsZ et avec lui-même (Singh et al., 2008). Chez *B. subtilis*, l'absence concomitante de FtsA et de SepF est létale, et la sur-expression de SepF permet de compléter un mutant de délétion de FtsA. Par ailleurs, SepF possède une hélice amphipatique N-terminale. Ces observations suggèrent un rôle redondant de SepF et FtsA pour l'ancrage de FtsZ à la membrane. *In vitro*, SepF polymérise sous la forme d'une large structure en forme d'anneau. Lorsque les anneaux de

SepF sont mis en présence de filaments de FtsZ, ces derniers sont capturés dans les structures formées par SepF (voir p. 30, ;Fig. 7, panneau 3) (Gündoğdu et al., 2011). Un modèle propose que SepF formerait des demi-anneaux au niveau de la zone d'invagination de la membrane, permettant l'ancrage de FtsZ à la membrane et un regroupement de ses filaments pour stabiliser l'assemblage des machineries de division et de synthèse de la paroi (Duman et al., 2013). Chez le pneumocoque, l'inactivation du gène *ylmF* provoque la formation de cellules allongées montrant en de nombreux endroits des septa avortés (Fadda et al., 2003).

### **EzrA**

La protéine EzrA a été découverte comme étant un régulateur négatif de la polymérisation de FtsZ chez *B. subtilis*. EzrA n'est pas essentielle chez *B. subtilis* et *E. coli* mais elle est nécessaire au bon fonctionnement de la division cellulaire. Son absence est caractérisée chez *B. subtilis* par la formation de multiples anneaux Z localisés au centre et aux pôles de la cellule (Haeusser et al., 2004). EzrA est distribuée le long de la membrane cellulaire durant la croissance avant de se localiser au site de division, potentiellement recrutée par FtsZ (Levin et al., 1999). Elle se lie de façon stœchiométrique à la région C-terminale de FtsZ (Singh et al., 2007) et inhibe la polymérisation de FtsZ en diminuant l'affinité de cette dernière pour le GTP et en accélérant sa vitesse d'hydrolyse du GTP (Chung et al., 2007). EzrA n'est cependant pas capable de dépolymériser des polymères de FtsZ pré-assemblés *in vitro* (Haeusser et al., 2004). Cela suggère qu'une fois formés, l'anneau Z pourrait résister à son interaction avec EzrA et que cette dernière pourrait jouer un rôle dans l'organisation des filaments au sein de l'anneau. La résolution de la structure cristallographique de EzrA a par ailleurs montré que la protéine adopte un repliement en forme de demi-cercle, dont le diamètre serait suffisamment large pour accommoder un filament de FtsZ, voire même un filament de FtsZ associé à un filament de FtsA (Fig. 13) (Cleverley et al., 2014). Dans ce modèle, l'association d'EzrA à FtsZ limiterait les interactions entre les filaments de FtsZ et constituerait un moyen supplémentaire d'ancrer l'anneau Z à la membrane. Il a par ailleurs été montré qu'EzrA connecte l'anneau Z à la machinerie de synthèse de la paroi chez *S. aureus*, *B. subtilis* et *S. pneumoniae* (Claessen et al., 2008; Steele et al., 2011; Fleurie et al., 2014a). Chez ces deux dernières espèces, il semblerait de plus qu'EzrA coordonnerait les phases d'élongation et de septation en connectant FtsZ à DivIVA et GpsB, elles-mêmes en interaction avec les machineries de synthèse de la paroi (Claessen et al., 2008; Fleurie et al., 2014a). Le rôle d'EzrA dans la

division serait donc multiple et concernerait la dynamique d'assemblage, l'organisation et la stabilisation de l'anneau Z, ainsi que la connection de ce dernier avec les machineries de synthèse de la paroi.



**Figure 13** : modèle d'interaction d'un dimère d'EzrA (bleu clair et bleu foncé) avec FtsZ (vert) et FtsA (rouge). EzrA est présenté en tant que dimère antiparallèle associé à la membrane par une hélice transmembranaire (gris) et qui stabiliserait l'ancrage de FtsA et FtsZ à la membrane. D'après (Cleverley et al., 2014)

### ZapA et ZapB

ZapA est une protéine non essentielle chez *E. coli* et son absence n'induit pas de phénotype visible en microscopie optique conventionnelle. Cependant, l'absence de ZapA couplée à une baisse d'expression de FtsZ est létale (Gueiros-Filho and Losick, 2002). Par ailleurs, une étude en microscopie PALM a montré qu'en absence de ZapA chez *E. coli*, les amas (« clusters ») de FtsZ sont plus nombreux, contiennent moins de molécules de FtsZ et leur localisation septale est affectée par rapport à la souche sauvage (Buss et al., 2013). Sachant que ZapA forme un tétramère *in vitro* et crée des enchevêtrements dans les filaments de FtsZ, l'ensemble de ces données suggère un rôle d'organisation des filaments de FtsZ au sein de l'anneau. Chez le pneumocoque, ZapA est conservée et ne serait pas essentielle (Massidda et al., 2013).

ZapB est une protéine interagissant conjointement avec FtsZ et ZapA chez *E. coli*. Alors qu'une revue affirme que la séquence codante de ZapB serait retrouvée dans le génome du pneumocoque (Massidda et al., 2013), le gène *spr0367* mentionné dans cette revue ne possède pas de ressemblance significative avec les protéines Zap.

Le rôle des protéines Zap chez le pneumocoque n'a pas toujours pas été étudié.

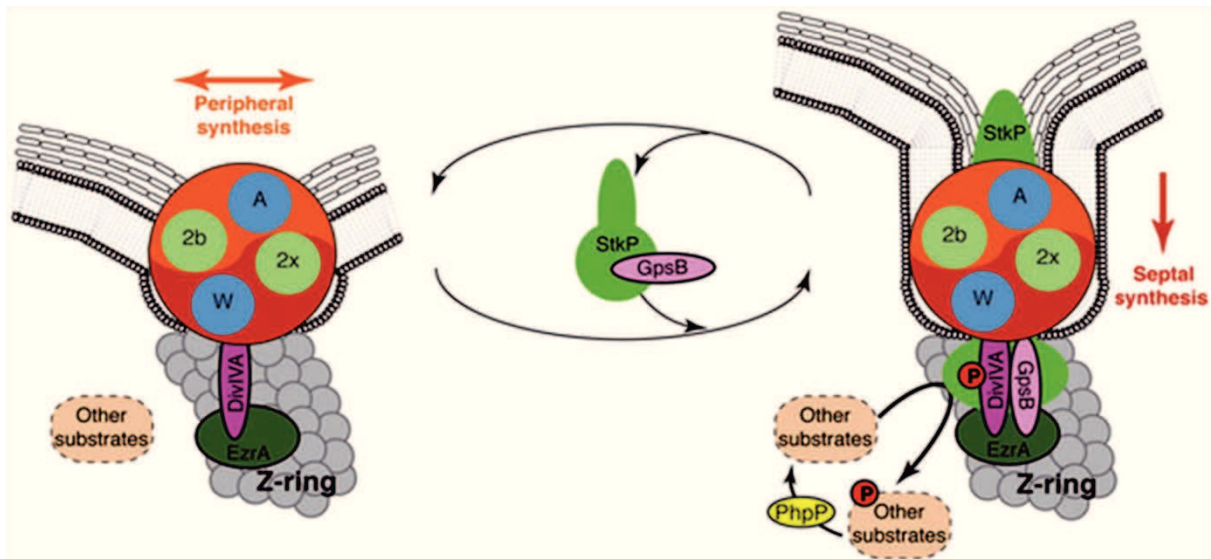
## **FtsK**

La translocase d'ADN FtsK fut identifiée chez *E. coli* par recherche de mutants ayant un phénotype de cellules filamenteuses (Begg et al., 1995). Chez *E. coli*, FtsK interagit avec FtsZ, et est l'une des premières protéines à être présente au septum après FtsZ et FtsA. Elle est indispensable au recrutement d'autres protéines nécessaires à la division (Grenga et al., 2008). Il existe deux homologues de FtsK dans le génome de *B. subtilis* : SpoIIIE et SftA. SpoIIIE est requis pour la translocation de l'ADN chromosomal dans la présore (Wu and Errington, 1994) tandis que SftA est impliquée dans la croissance végétative (Biller and Burkholder, 2009). Ces protéines permettent la répartition correcte des chromosomes. Une séquence codante homologue à FtsK/SpoIIIE (44% d'identité avec SpoIIIE de *B. subtilis*) est retrouvée chez le pneumocoque mais ne serait pas essentielle. Dans le pneumocoque, la protéine FtsK se localise au septum et interagirait avec FtsZ (Le Bourgeois et al., 2007; Maggi et al., 2008).

## **DivIVA**

DivIVA est une protéine présente au niveau des pôles cellulaires et au septum. Sa localisation est guidée par une association à la membrane dans les zones de forte courbure (Lenarcic et al., 2009; Ramamurthi and Losick, 2009). Chez *B. subtilis*, DivIVA est nécessaire à la localisation des protéines du système Min (Edwards and Errington, 1997). Chez *S. pneumoniae* qui ne possède pas le système Min, cette protéine a un rôle différent. En son absence, les cellules de pneumocoque sont plus rondes et forment de longues chaînes, un phénotype qui traduit une inhibition de l'élongation et un défaut de séparation des cellules (Fadda et al., 2003; Fleurie et al., 2014a). Dans ce mutant, le marquage fluorescent des zones de synthèse de la paroi a effectivement confirmé que seule la synthèse septale est active (Fleurie et al., 2014a). Alors qu'une interaction a été montrée entre FtsZ et DivIVA chez *B. subtilis* (Perry and Edwards, 2006), cette interaction ne semble pas être aussi claire chez *S. pneumoniae*. Dans un premier temps, des expériences de double hybride ont suggéré des interactions entre DivIVA et plusieurs protéines dont FtsZ, ZapA, FtsA, FtsK et EzrA (Fadda et al., 2006). Alors que l'interaction de DivIVA avec EzrA, ainsi qu'avec GpsB, fut confirmée par résonance plasmonique de surface, l'interaction avec FtsZ ne fut pas détectée par cette méthode (Fleurie et al., 2014a). DivIVA est enfin un substrat de la Ser/Thr kinase StkP et sa phosphorylation est impliquée dans la morphogenèse du pneumocoque (Fleurie et al., 2012). L'équipe de C. Grangeasse a proposé un modèle dans lequel la triade StkP/DivIVA/GpsB

orchestrerait la synthèse de paroi dédiée à l'élongation et à la septation et connecterait ces processus à l'anneau Z via une interaction avec EzrA (Fig. 14). La forme non-phosphorylée de DivIVA stimulerait la synthèse d'élongation, l'arrivée de GpsB au septum recruterait StkP sur ce site, au niveau duquel StkP phosphorylerait DivIVA. La forme phosphorylée de DivIVA stimulerait la synthèse de paroi septale et inhiberait la synthèse d'élongation (Fleurie et al., 2014a).



**Figure 14 :** Modèle de basculement de la synthèse du PG dédiée à l'élongation vers la synthèse de PG dédiée à la septation impliquant la triade StkP/GpsB/DivIVA chez *S. pneumoniae*. Voir texte pour détails. D'après (Fleurie et al., 2014a).

### StkP et PhpP

StkP est une protéine bitopique qui possède un domaine cytoplasmique portant une activité de Ser/Thr kinase, un segment transmembranaire et un domaine extracellulaire composé de 4 domaines PASTA ((Penicillin-binding proteins And Ser/Thr protein kinase Associated domains) (Gordon et al., 2000; Yeats et al., 2002). Ses substrats connus à ce jour sont la phosphoglutamine mutase GlmM (synthèse des précurseurs de la paroi), MapZ (régulation du positionnement de l'anneau Z), DivIVA (orchestration de l'élongation et de la division), la pyrophosphatase PpaC et le régulateur transcriptionnel RitR (expression du transporteur de l'hème) (Fleurie et al., 2012, 2014a, 2014b). Une phosphorylation des protéines du pneumocoque FtsA et FtsZ par StkP a été montrée *in vitro* (Beilharz et al., 2012; Giefing et al., 2010). Ce résultat fut également obtenu avec les orthologues de StkP et FtsZ chez *S. agalactiae* (Silvestroni et al., 2009). StkP présente une localisation septale et la constriction de sa structure annulaire suit la même dynamique que celle de PBP2b (Fig. 11, Tsui et al., 2014). La délétion de StkP, la troncation de ses différents domaines ou

l'inactivation de son activité kinase entraînent différentes aberrations morphologiques qui mettent en évidence le rôle majeur de StkP dans la régulation de la morphogenèse et de la division du pneumocoque. Les phénotypes des différents variants de StkP mettent également en évidence l'existence des deux modes de synthèse de paroi, l'un dédié à l'élongation et l'autre à la septation (voir paragraphe III.B.iii et la figure 5) (Fleurie et al., 2012).

PhpP est la phosphatase qui est co-transcrite avec StkP et qui servirait à déphosphoryler les substrats de StkP, ou bien StkP elle-même. Bien que PhpP soit une protéine cytoplasmique, elle est liée à la membrane via son interaction avec StkP (Nováková et al., 2005; Osaki et al., 2009). L'action combinée de StkP et de PhpP permettrait une régulation fine des processus d'élongation et de division du pneumocoque (Fig. 14).

### **ClpX**

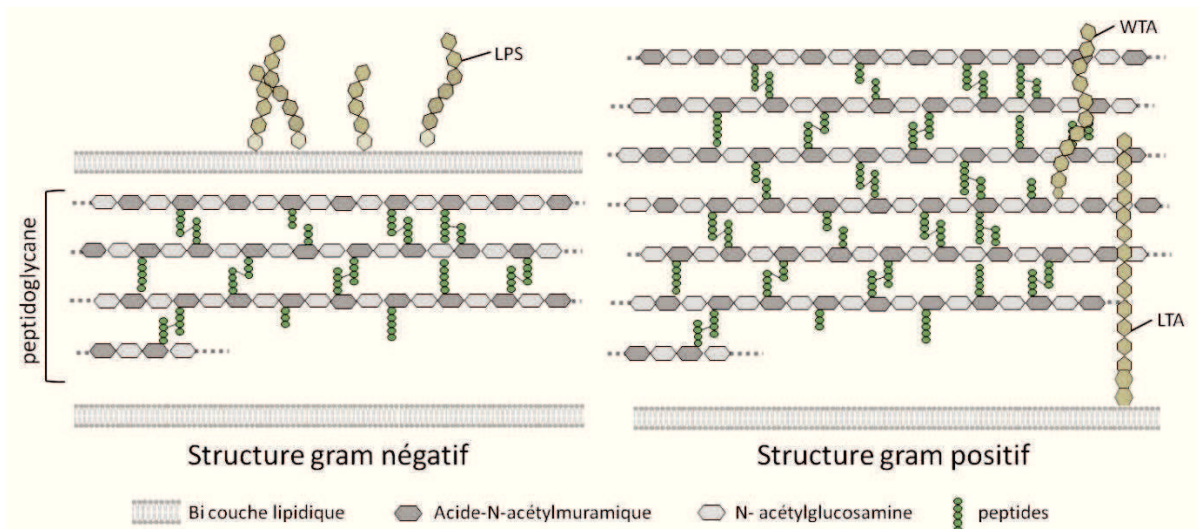
ClpX est une protéine chaperonne du complexe ClpXP dans lequel ClpP possède une activité protéase tandis que ClpX est la protéine de reconnaissance du substrat. ClpX forme un hexamère possédant une activité ATPase nécessaire au dépliement des protéines avant leur dégradation par ClpP. Chez *B. subtilis*, ClpX inhibe directement l'assemblage de FtsZ, indépendamment de son activité chaperonne ou ATPase (Haeusser et al., 2009; Weart et al., 2005). Cette inhibition est médiée par la séquestration des monomères et des petits oligomères de FtsZ, ce qui permettrait de constituer une réserve cytoplasmique de molécules monomériques (Sugimoto et al., 2010). De manière surprenante, des résultats contradictoires ont été trouvés pour *E. coli* chez qui ClpX déplierait et dégraderait les polymères de FtsZ avec l'aide de ClpP (Camberg et al., 2009). Cette dégradation permettrait de moduler le renouvellement des filaments de FtsZ, ainsi que l'équilibre entre les monomères et les polymères de FtsZ. Aucune étude de ClpX n'a été effectuée chez le pneumocoque, bien que sa séquence codante soit présente dans son génome et qu'elle puisse potentiellement jouer un rôle important dans la dynamique de l'anneau Z.



## C. La paroi bactérienne

### i. Gram positif et Gram négatif

En 1884, un test de coloration mis au point par Hans Christian Gram, a permis de mettre en évidence une différence entre deux classes de bactéries en fonction des propriétés de leur paroi cellulaire. Ce test est basé sur des étapes de coloration/décoloration des éléments cytoplasmiques. L'étape de décoloration à l'alcool est efficace chez les bactéries à Gram négatif alors qu'elle est inefficace chez les bactéries à Gram positif, engendrant une différence de coloration entre les deux classes. Les bactéries à Gram négatif possèdent une enveloppe constituée d'une membrane cytoplasmique, d'une paroi cellulaire de taille restreinte (4-10 nm d'épaisseur) et d'une membrane externe (Gan et al., 2008; Jiang et al., 2004; Yao et al., 1999). Les bactéries à Gram positif possèdent une enveloppe constituée d'une membrane cytoplasmique et d'une paroi cellulaire épaisse (20-80 nm d'épaisseur), comprenant un constituant supplémentaire, les acides téichoïques (Fig. 15) (Matias and Beveridge, 2007; Schleifer and Kandler, 1972; Wyatt, 1970). Cette coloration ne permet pas une classification phylogénique stricto sensu des bactéries mais les bactéries à Gram positif sont prédominantes dans les phylums *Firmicutes* et *Actinobactéries* (Vesth et al., 2013).



**Figure 15** : Représentation schématique de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif et Gram positif.

## ii. Composition de la paroi du pneumocoque

### 1. *Le peptidoglycane*

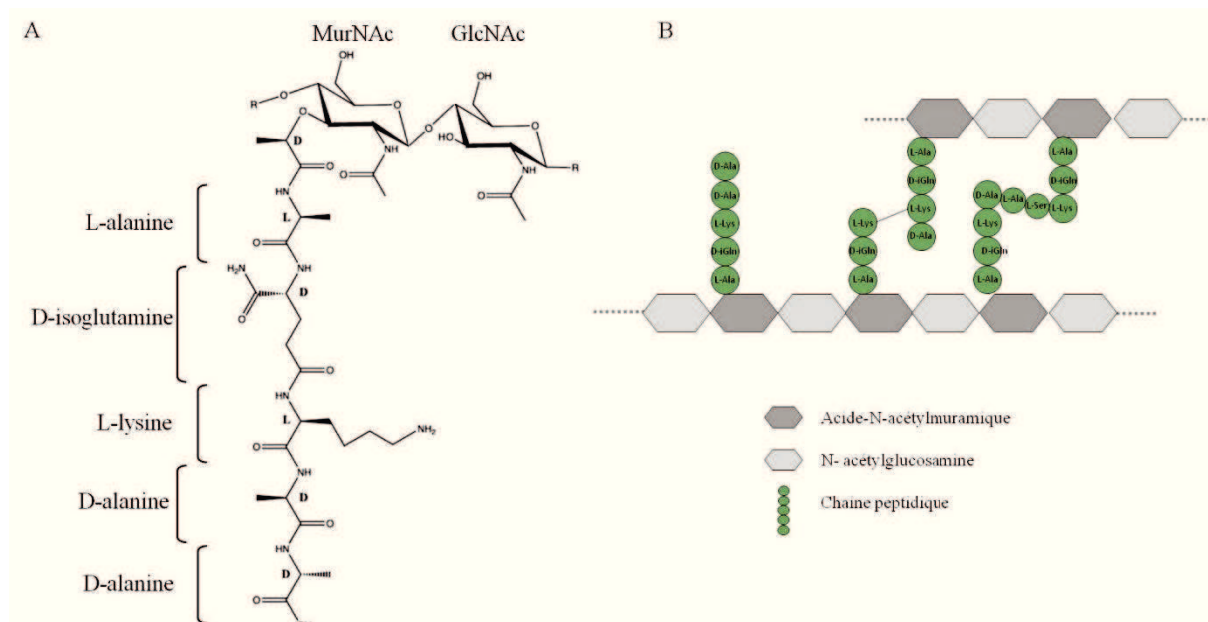
L'un des constituants principaux de la paroi cellulaire est le peptidoglycane (PG), un réseau polymérique qui enveloppe le cytoplasme. Le PG donne sa forme à la cellule, empêche la lyse due à la pression osmotique du cytoplasme, (de 3-5 atm jusqu'à 25 atm chez *E. coli*) et offre des sites de fixations pour divers éléments de l'enveloppe bactérienne (détaillé ci-dessous) (Young, 2006; Vollmer et al., 2008a). Le PG est composé de chaînes glycanes réticulées les unes aux autres par des chaînes peptidiques. Le PG est un polymère à propriété élastique, principalement le long de l'axe longitudinal de la cellule (Yao et al., 1999). Cette propriété serait due non pas aux chaînes glycanes qui sont plutôt rigides, mais principalement à l'élasticité des chaînes peptidiques (Barnickel et al., 1979). La conformation tridimensionnelle du PG (orientation et distribution des chaînes glycanes) est encore débattue à ce jour mais deux modèles sont privilégiés : le modèle dit superposé (« layered »), où les chaînes de glycanes sont parallèles à la membrane cytoplasmique, et le modèle en échafaudage (« scaffold ») dans lequel les chaînes glycanes sont perpendiculaires à la membrane cytoplasmique (Vollmer et al., 2008b).

### Les chaînes polysaccharidiques

Les chaînes polysaccharidiques se composent d'une alternance de *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) et d'acide *N*-acetyl-muramique (MurNAc), reliés par une liaison osidique  $\beta$ -1,4 (Fig. 16) (Höltje, 1998; Schleifer and Kandler, 1972). La taille d'un disaccharide MurNAc-GlcNAc est de 1 nm (Braun, 1973). La composition chimique des chaînes glycanes peut montrer quelques variations selon les espèces, notamment dues à l'acétylation potentielle des sucres, qui sera discutée dans un paragraphe distinct (paragraphe III.D.ii).

La longueur des chaînes glycanes varie en fonction de l'espèce et des conditions de croissance. Il n'y a pas de corrélation entre la longueur des chaînes glycanes et la taille des bactéries ou leur appartenance à la classification Gram positif ou Gram négatif. Les chaînes glycanes de *E. coli* possèdent environ 30 disaccharides (Glauner and Höltje, 1990; Harz et al., 1990; Vollmer and Höltje, 2004) alors que les chaînes glycanes de *S. aureus* sont bien plus courtes avec des valeurs moyennes de 6 disaccharides (Boneca et al., 2000). *B. subtilis*

possède des chaînes glycanes de grande taille dont certaines pouvant atteindre 500 dimères et qui pourraient résulter de l'assemblage de chaînes glycanes précurseurs plus courtes (Hayhurst et al., 2008; Wheeler et al., 2011). Chez le pneumocoque, il a été impossible de déterminer par HPLC à phase inverse une taille précise pour les chaînes glycanes (Bui et al., 2012; Wheeler et al., 2011). En utilisant une HPLC d'exclusion de taille, Wheeler et al. ont déterminé qu'environ 50% des chaînes glycanes ont une taille supérieure à 50 disaccharides, dont 20% sont composées de plus de 100 disaccharides (Wheeler et al., 2011). Ces proportions sont proches de celles retrouvées pour le PG de *B. subtilis*. Des phénomènes de maturation, tel que des coupures par des hydrolases (SagB, MltG) ou des modifications post-synthétiques ont une influence sur la longueur des chaînes et seront discutés dans un paragraphe indépendant.



**Figure 16 :** A) Unité de base formant le PG contenant un dimère de sucres GlcNAc et MurNAc, ce dernier portant la chaîne peptidique composée de L-alanine, D-isoglutamine, L-Lysine et de deux D-Alanine. B) Représentation schématique du PG chez *S. pneumoniae*.

### Les chaînes peptidiques

Chaque MurNAc porte une chaîne peptidique qui substitue le groupe D-lactoyl présent sur le carbone 4. Une chaîne peptidique peut être liée à une chaîne peptidique voisine, permettant de lier les chaînes glycanes auxquelles elles sont rattachées. La composition de la chaîne peptidique est très variable et dépend de l'espèce bactérienne (Tableau 2). La chaîne

peptidique de *S. pneumoniae* est un pentapeptide dont la composition est la suivante : L-Alanine, D-isoglutamine, L-Lysine, D-Alanine et D-Alanine (Fig. 16.A et tableau 2).

Position	Résidu rencontré	Exemples d'organismes
1	L-Ala	La plupart des espèces
	Gly	<i>Mycobacterium leprae</i> , <i>Brevibacterium imperiale</i>
	L-Ser	<i>Butyribacterium rettgeri</i>
2	D-isoglutamate	La plupart des bactéries à Gram négatif
	D-isoglutamine	La plupart des bactéries à Gram positif, Mycobactéries
	threo-3-Hydroxyglutamate	<i>Microbacterium lacticum</i>
3	méso-A <sub>2</sub> pm	La plupart des bactéries à Gram négatif, Bacilli, Mycobactéries
	L-Lys	La plupart des bactéries à Gram positif
	meso-A <sub>2</sub> pm amidée	<i>Bacillus subtilis</i>
	L-Orn	<i>Spirochetes</i> , <i>Thermus thermophilus</i>
4	D-Ala	Toutes les bactéries
5	D-Ala	La plupart des bactéries
	D-Ser	<i>Enterococcus gallinarum</i>
	D-Lac	<i>Lactococcus casei</i> , Enterococci ayant acquis une résistance à la vancomycine

**Tableau 2** : Occurrence des résidus présents dans la chaîne peptidiques du PG. (simplifié et modifié de (Vollmer et al., 2008b)).

Dans le PG, les chaînes peptidiques sont rarement présentes sous la forme de pentapeptides (Fig. 16.B). Chez le pneumocoque, 36% des chaînes peptidiques restent monomériques et sont majoritairement des tripeptides (~80%), résultant de la perte des deux dernières D-alanines. 64% des chaînes peptidiques sont liées à une ou deux chaînes voisines, formant des dimères tri-trérapeptidiques (~26%) ou des trimères tri-tétra-térapeptidiques (~10%) (Bui et al., 2012). Les chaînes peptidiques peuvent être pontées de manière directe, par une liaison entre la L-Lysine en position 3 et la D-Alanine en position 4, ou indirecte, par l'intermédiaire de dipeptides Alanine-Alanine ou Serine-Alanine liés aux L-Lysines en position 3 (Bui et al., 2012; Fiser et al., 2003; Garcia-Bustos et al., 1987).

## 2. Les acides téichoïques

Les acides téichoïques (du grec « teichos » signifiant « wall », i.e. la paroi) sont des unités polysaccharidiques présentes dans la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif et ont été découverts dans les années 50 (Armstrong et al., 1959). D'après plusieurs études

(Ellwood, 1970; Neuhaus and Baddiley, 2003), ils seraient la structure la plus abondante dans la paroi cellulaire, composant plus de 50% de sa masse totale sèche. Certains acides téichoïques s'étendent jusqu'en dehors du PG (Aasjord and Grov, 1980; Matias and Beveridge, 2006, 2007) alors que d'autres seraient présents seulement entre la membrane et la couche de PG (Aasjord and Grov, 1980; Matias and Beveridge, 2008). Ils sont retrouvés sous deux formes : liés de façon covalente à la paroi (Wall teichoic acid, WTA) ou liés via un glycolipide à la membrane lipidique (Lipoteichoic acid, LTA) (Fischer, 1997). Ils sont composés d'une unité de liaison disaccharide [ManNAc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc] conservée entre les espèces, puis d'unités de répétitions composées de ribitol-phosphate ou de glycérol-phosphate. Les unités répétées sont hautement diversifiées entre différentes espèces et au sein d'une même espèce, suggérant que cette diversité soit non seulement dépendante de l'espèce bactérienne, mais également des conditions de culture (Vinogradov et al., 2006). Malgré leurs ressemblances au niveau des unités répétées chez certains organismes, la voie de biosynthèse des WTA est différente de celle des LTA (Shockman and Slade, 1964), excepté chez *S. pneumoniae*.

Les acides téichoïques de *S. pneumoniae* font figure d'exception. Contrairement à la plupart des bactéries, la composition des WTA et des LTA du pneumocoque est identique, ce qui suggère une voie de biosynthèse des précurseurs commune, précédant la différenciation entre WTA et LTA (Denapaite et al., 2012; Seo et al., 2008). Le pneumocoque présente la particularité d'avoir des acides téichoïques décorés de résidus phosphocholines, provenant exclusivement de choline exogène (Fischer, 1997; Tomasz, 1967, 1968), et qui permettent l'ancrage de protéines liant la choline (choline-binding proteins, CBP) à la surface du pneumocoque. Les acides téichoïques jouent un rôle dans des mécanismes cellulaires tels que l'homéostasie en cations (via leurs charges anioniques), les interactions hôte-pathogène et la susceptibilité/résistance aux peptides antimicrobiens, la régulation de l'activité d'enzymes autolytiques telles que LytA ou encore la morphogénèse et la division bactérienne (Brown et al., 2013; Weidenmaier and Peschel, 2008).

Lorsque les bactéries *S. aureus* (Gründling and Schneewind, 2007) ou *B. subtilis* (Bhavsar et al., 2001; D'Elia et al., 2006) ne produisent pas d'acides téichoïques, des anomalies morphologiques sont observées, incluant une augmentation de la taille de la cellule et des défauts de positionnement du septum. Ceci démontre que les acides téichoïques ont un rôle dans la synthèse du PG. Chez *S. pneumoniae*, l'absence de la protéine impliquée dans la

synthèse des acides téichoïques, LytR, provoque des aberrations morphologiques liées à un défaut de septation (Johnsborg and Håvarstein, 2009b). Ce phénotype suggère l'existence d'une interaction entre la machinerie de synthèse de la paroi et celle des acides téichoïques, hypothèse vérifiée par plusieurs études chez *B. subtilis* et *S. aureus* (Atilano et al., 2010; Formstone et al., 2008; Kawai et al., 2011; Reichmann et al., 2014; Schirner et al., 2015).

### **iii. Synthèse du peptidoglycane chez *S. pneumoniae***

#### ***1. Synthèse du précurseur et flippases***

Le précurseur du PG est le lipide II, un disaccharide MurNac-GlcNac associé à une chaîne pentapeptidique (L-Ala, D-isoGln, L-Lys, D-Ala, D-Ala) et lié à la membrane par un groupement undécaprényl phosphate. La synthèse du lipide II résulte d'une cascade de réactions catalysées dans le cytoplasme par les enzymes Mur. Chez le pneumocoque, la dernière étape consiste en l'amidation du résidu en 2<sup>ème</sup> position de la chaîne peptidique, catalysée par le complexe amido-transferase MurT/GatD qui transforme un acide glutamique (D-Glu) en isoglutamine (D-isoGln) (Münch et al., 2012). La conversion de D-Glu en D-isoGln est nécessaire à la reconstitution *in vitro* de la synthèse du PG par les PBPs de *S. pneumoniae* (Zapun et al., 2013). *In vivo*, l'absence d'amidation est à l'origine d'une croissance altérée et d'une augmentation de la résistance aux  $\beta$ -lactames et au lysozyme chez *S. aureus* (Figueiredo et al., 2012).

Suite à sa synthèse cytoplasmique, le lipide II est transloqué vers l'extérieur de la cellule par les flippases RodA et FtsW, deux protéines respectivement essentielles à la synthèse de paroi dédiée à l'élongation et à la septation (Gérard et al., 2002; Thibessard et al., 2002; Noirclerc-Savoye et al., 2003; Land and Winkler, 2011; Noirclerc-Savoye et al., 2013). Dernièrement, un rôle dans l'export du lipide II a été mis en évidence pour une autre famille de flippases incluant la protéine MurJ (Ruiz, 2008; Sham et al., 2014). La séquence codante de MurJ est retrouvée dans le génome du pneumocoque mais aucune étude n'a pour le moment été effectuée pour déterminer son rôle dans cette bactérie (Meeske et al., 2015).

#### ***2. Incorporations des précurseurs à l'ancien peptidoglycane***

L'incorporation du lipide II au PG est effectuée par les protéines liant la pénicilline ou PBPs (Penicillin Binding Proteins). Les PBPs ont deux types d'activités : une activité

glycosyl transférase (GT) permettant la polymérisation des chaînes de sucre et une activité transpeptidase (TP) qui pontent les chaînes peptidiques (van Heijenoort, 2001).

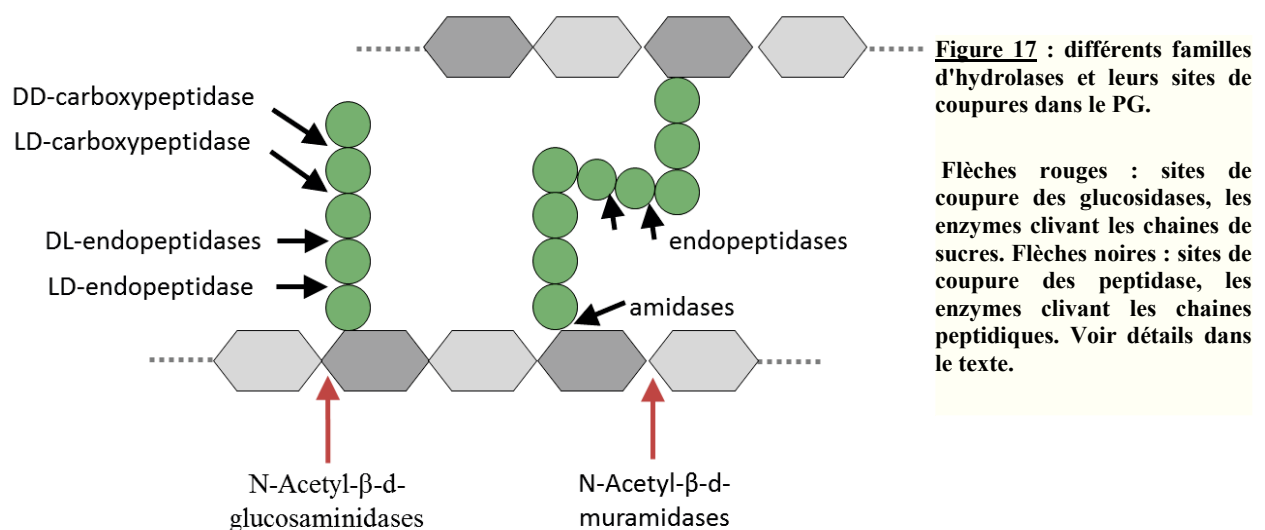
Au cours de la transglycosylation, le lipide II est intégré à une chaîne glucidique via la formation d'une liaison  $\beta$ -1,4 entre les résidus MurNAc et de GlcNAc. La réaction de transpeptidation implique une rupture de la liaison covalente entre les deux D-alanines terminales du pentapeptide donneur et la formation d'une liaison covalente entre le quatrième D-alanine et la sérine active de l'enzyme. Cette liaison est transférée sur l'amine primaire d'un résidu en position 3 d'une chaîne voisine pour finaliser la transpeptidation (Sauvage et al., 2008). Pour catalyser ces réactions, il existe deux catégories de PBPs : les PBPs de classe A bifonctionnelles qui possèdent les activités GT et TP (PBP1a, PBP1b et PBP2a chez *S. pneumoniae*) et les PBPs de classe B n'ayant que l'activité TP (PBP2x et PBP2b chez *S. pneumoniae*). Contrairement aux PBPs de classe A qui ne sont pas essentielles, les PBPs de classe B sont essentielles à la survie du pneumocoque (Kell et al., 1993; Paik et al., 1999). Alors que PBP2b et PBP2x sont spécifiquement et respectivement impliquées dans la synthèse de paroi dédiée à l'élongation et à la septation (Berg et al., 2013; Philippe et al., 2014), l'implication des PBPs de classe A dans ces deux processus reste incertaine. La localisation de PBP1a, son interaction génétique avec les protéines MreC et MreD et la taille réduite des mutants de délétion de PBP1a suggèrent que cette dernière participe préférentiellement à la synthèse de PG dédiée à l'élongation (Claessen et al., 2008; Land et al., 2011; Philippe et al., 2014; Tsui et al., 2014).

Afin d'augmenter la taille de la cellule, le lipide II est incorporé dans le PG préexistant. Cette action va nécessiter l'ouverture contrôlée du réseau de PG par des hydrolases de la paroi et la coordination fine de cette hydrolyse ménagée avec l'insertion de nouveau matériel par les PBPs.

## D. Remodelage et maturation de la paroi

### i. Dégradation du peptidoglycane

Les hydrolases de la paroi cellulaire représentent un groupe d'enzymes nombreuses et variées, appartenant à différentes familles enzymatiques définies par le type de liaison chimique qu'elles sont capables de couper dans le PG (Fig. 17). Les activités hydrolytiques de ces enzymes pouvant provoquer la lyse de la bactérie, elles doivent être finement régulées dans le temps et dans l'espace.

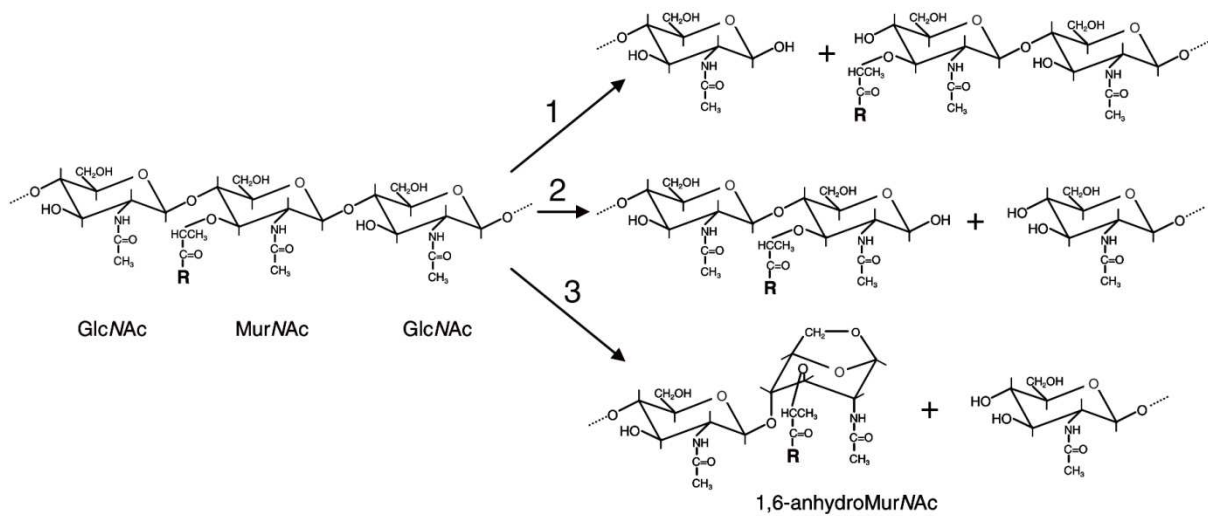


Il existe deux types de glucosidases clivant la liaison  $\beta$ -1,4 entre les unités sacchariques des chaînes glycanes. Les *N*-acetyl- $\beta$ -d-glucosaminidases (**glucosaminidases**) hydrolysent la liaison entre les résidus GlcNac et MurNac (Fig. 18-1) tandis que les *N*-acetyl- $\beta$ -d-muramidases (**muramidases**) hydrolysent la liaison entre le résidu MurNac et le résidu GlcNac (Fig. 18-2 et 18-3). Une des muramidases les plus connues est le lysozyme, une hydrolase bactériolytique découverte par Alexander Fleming en 1922 et présente dans une vaste majorité d'organismes eucaryotes. Chez les plantes et les animaux, cette hydrolase est une défense naturelle contre les bactéries pathogènes. Les bactéries possèdent elles aussi des hydrolases de type lysozymal qui sont nommées **lysozymes bactériens** (ou bLysozymes).

Les **transglycosylases lytiques** (LTs) constituent une autre classe de muramidases. Alors que les muramidases utilisent l'eau pour cliver la liaison osidique, les LTs utilisent le groupe hydroxyle porté par le carbone 6 du MurNac, générant un produit MurNac 1,6-anhydro (Fig.



18-3). Les LTs ne sont donc pas à proprement parler des hydrolases mais elles sont néanmoins communément incluses dans cette catégorie.



**Figure 18 :** Clivage des différentes liaisons présentes dans le PG par des glucosaminidases (1) ou par des muramidases de type lysozyme (2) ou de type transglycosylase lytique (3). D'après (Vollmer et al., 2008a).

Parmi les hydrolases qui clivent la chaîne peptidique, on trouve des L-alanyl-D-glutamate endopeptidases (**L,D-endopeptidases**) qui clivent la liaison entre le premier résidu L-Ala et le second résidu D-Glu/D-isoGln, et des **D,L-endopeptidases** clivent la liaison entre le résidu D-Glu/D-isoGln et l'acide aminé présent en position 3 (L-Lysine chez le pneumocoque). Les **D,D-carboxypeptidases** et **L,D-carboxypeptidases** quant à elle clivent le dernier et avant-dernier résidu D-Ala pour générer respectivement un térapeptide et un tripeptide. Il existe enfin d'autres endopeptidases qui clivent les liaisons présentes au niveau du pont interpeptidique, telle que LytM qui clive les branchements poly-glycines qui relient les chaînes peptidiques dans le peptidoglycane de *S. aureus* (Ramadurai and Jayaswal, 1997) (Fig. 17).

Un dernier type d'hydrolases de la paroi hydrolysent la liaison entre la chaîne glycanique et la chaîne peptidique, c'est-à-dire entre le MurNAc et le premier acide aminé L-Ala, il s'agit des *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidases (**amidases**).

Les hydrolases du PG sont impliquées dans une grande variété de processus cellulaires (Smith et al., 2000; Vollmer et al., 2008a) incluant:

- L'expansion du PG
- Le clivage de la paroi septale et la séparation des cellules filles
- Le renouvellement et le recyclage du PG
- La motilité bactérienne
- La compétence
- La sporulation
- La lyse cellulaire
- La pathogénicité bactérienne.

Le nombre d'hydrolases de la paroi présentes dans les génomes bactériens est très différent en fonction des espèces. *B. subtilis* par exemple nécessite un grand nombre d'hydrolases impliquées dans divers processus cellulaires comprenant la croissance végétative, la motilité, la compétence et la sporulation. Plus de 30 hydrolases sont retrouvées chez *B. subtilis* et *E. coli* tandis que seulement 5 hydrolases ont été identifiées chez *L. lactis* (quatre glucosidases et une endopeptidase) (van Heijenoort, 2011; Smith et al., 2000). Douze hydrolases de la paroi cellulaire ont été identifiées chez *S. pneumoniae*, la majorité d'entre elles étant peu ou pas encore caractérisées à ce jour (Tableau 3) (Barendt et al., 2011, informations groupe PG).

## **ii. Les hydrolases de *S. pneumoniae***

La caractérisation des hydrolases dans les organismes modèles comme *E. coli* et *B. subtilis* est compliquée car ces bactéries possèdent un grand nombre d'hydrolases avec des fonctions redondantes. En revanche, *S. pneumoniae* possède non seulement un plus petit nombre d'hydrolases mais celles-ci semblent avoir des fonctions uniques puisque leur délétion ou leur déplétion isolée se traduit par des phénotypes morphologiques marqués. Dans la suite de ce paragraphe, nous nous intéresserons seulement aux hydrolases de *S. pneumoniae*.

Nom	Gène (R6)	Référence Uniprot	Classe d'hydrolase	Morphologie des mutants de délétion ou de déplétion	localisation	Publications associées
<b><u>Hydrolases impliquées dans l'autolyse et le fratricide</u></b>						
CbpD	<i>spr2006</i>	<a href="#">Q8DMZ4</a>	Amidase/endopeptidase (putative)	WT	Septale	(Eldholm et al., 2010a)
LytC	<i>spr1431</i>	<a href="#">Q8DP07</a>	bLysozyme (Muramidase)	WT, courtes chaînes de cellules	Surface, faiblement enrichie au septum	(Pérez-Dorado et al., 2010)
LytA	<i>spr1754</i>	<a href="#">Q7ZAK4</a>	Amidase	WT, courtes chaînes de cellules	Variable au cours du cycle cellulaire (cytoplasmique, puis extracellulaire et septale)	(De Las Rivas et al., 2002; Mellroth et al., 2012)
<b><u>Hydrolases impliquée dans la croissance et la division</u></b>						
DacA	<i>spr0776</i>	<a href="#">Q8DQ99</a>	D,D-carboxypeptidase	Cellules asymétriques et/ou arrondies, défauts de septation	Hémisphérique puis septale lors de la constriction	(Barendt et al., 2011; Morlot et al., 2004)
DacB	<i>spr0554</i>	<a href="#">Q8DQ01</a>	L,D-carboxypeptidase	Cellules asymétriques et/ou arrondies, défauts de septation, longues chaînes	Hémisphérique puis septale lors de la constriction	(Barendt et al., 2011)
PcsB	<i>spr2021</i>	<a href="#">Q8DMY4</a>	Amidase/endopeptidase (putative)	Essentielle / Morphologie arrondie et irrégulière, défauts de septation et de séparation des cellules lors de sa déplétion	Septale	(Barendt et al., 2009; Sham et al., 2011; Bartual et al., 2014)
LytB	<i>spr0867</i>	<a href="#">P59206</a>	Glucosaminidase	WT, longues chaînes	Polaire	(De Las Rivas et al., 2002)
MltG	<i>spr1370</i>	<a href="#">Q8CYJ8</a>	Transglycosylase lytique (putative)	Essentielle / Morphologie du mutant de déplétion N.D.	N.D.	(Yunck et al., 2015)
Pmp23	<i>spr0930</i>	<a href="#">Q8DPY9</a>	Lytic transglycosylase/ bLysozyme (muramidase putative)	Cellules asymétriques et arrondies	N.D.	(Pagliero et al., 2008)
<b><u>Hydrolases de fonction inconnue</u></b>						
Spr1875	<i>spr1875</i>	<a href="#">Q8DN78</a>	Muramidase (Putative)	WT	N.D.	(Barendt et al., 2011)
Spr0890	<i>spr0890</i>	<a href="#">Q8CYV3</a>	Muramidase (Putative)	WT	N.D.	(Barendt et al., 2011)
Spr0168	<i>spr0168</i>	<a href="#">Q8DRE6</a>	L,D-carboxypeptidase (Putative)	WT	N.D.	(Barendt et al., 2011)

**Tableau 3** : répertoire des hydrolases de *S. pneumoniae* R6 donnant le nom de la protéine et du gène correspondant, leur numéro d'accèsion Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), leur activité démontrée ou putative, la morphologie des mutants de délétion ou de déplétion, leur localisation et les références associées. WT : sauvage, N.D. : Non Déterminé.

## ***1. Hydrolases impliquées dans l'autolyse et le fratricide***

Les autolysines sont des hydrolases dont l'activité mène à la lyse de la cellule qui les a produites alors que les hydrolases fratricides provoquent la lyse des cellules sœurs. Chez *S. pneumoniae*, ces hydrolases font partie d'un groupe particulier, les protéines liant la choline (Choline Binding Protein, CBP). Elles arborent un domaine liant la choline (Choline Binding Domain, CBD) qui permet l'attachement aux acides téichoïques.

Décrite en 1923, l'autolyse du pneumocoque est un processus induit par l'ajout d'antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactames, de détergents ou lors de la phase stationnaire de croissance (Avery and Cullen, 1923; Sanchez-Puelles et al., 1986). L'autolyse est provoquée par la dégradation du PG par l'amidase **LytA**. LytA est une protéine composée d'un domaine catalytique N-terminal suivi par un CBD et elle ne possède pas de séquence d'export. Lors de la phase de croissance, elle est cytoplasmique puis, lors de la phase stationnaire, elle est libérée dans le milieu de culture et se lie à la région septale des cellules de pneumocoque (Mellroth et al., 2012). Cette libération extracellulaire proviendrait d'une fracture de la membrane, libérant les éléments cytoplasmiques, dont LytA qui pourrait alors digérer le PG et entraîner l'autolyse. Lors d'ajout extracellulaire de LytA, la phase de croissance n'est pas impactée, alors que lorsque LytA est ajoutée en phase stationnaire, elle cause une lyse cellulaire immédiate (Mellroth et al., 2012; Tomasz and Waks, 1975). Cette expérience montre que la régulation de l'activité de LytA s'effectue à plusieurs niveaux: la protéine est non seulement séquestrée dans le cytoplasme mais un second mécanisme existe pour protéger le PG de l'action lytique de LytA lors de la phase exponentielle de croissance.

Le fratricide est un phénomène observé au cours de la compétence, qui permet la libération d'ADN dans le milieu extérieur afin de favoriser l'intégration d'ADN exogène par les cellules compétentes. Chez *S. pneumoniae*, ce phénomène implique les hydrolases CbpD, LytA et LytC (Claverys and Håvarstein, 2007).

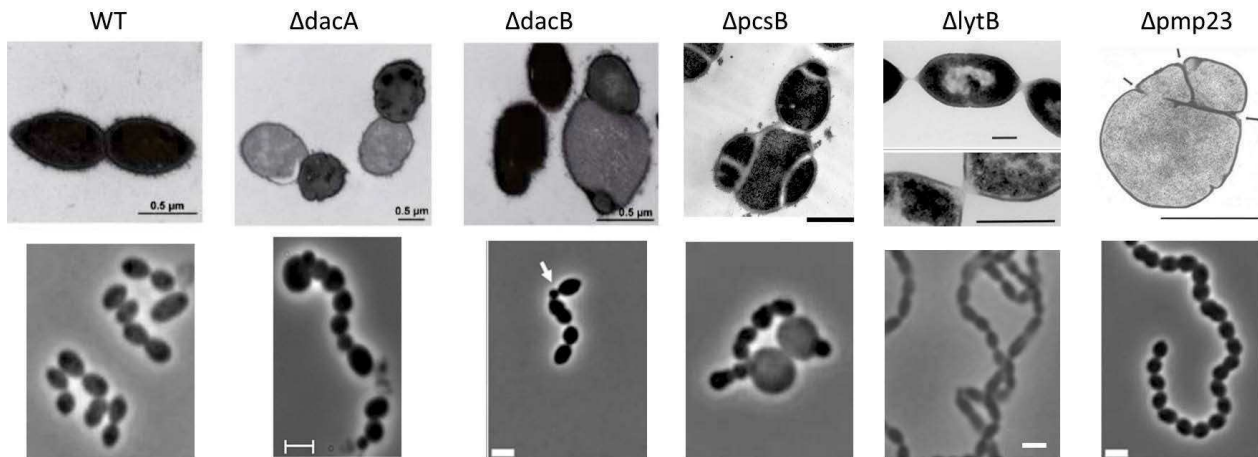
**CbpD** est une hydrolase soluble qui s'attache aux acides téichoïques par son domaine de liaison à la choline. CbpD comprend un domaine N-terminal CHAP (Cysteine, Histidine-dependent Amidohydrolase/Peptidase) suivi de deux domaines SH3b (pour Src-homology 3b) de reconnaissance et d'attachement au PG, puis d'un CBD C-terminal. Le domaine CHAP est supposé avoir une activité amidase ou endopeptidase mais cette activité n'a jamais été caractérisée *in vitro*. Le domaine CBD est responsable de la localisation de CbpD au septum, au niveau duquel elle exerce son activité hydrolytique (Eldholm et al., 2010a). CbpD est

impliquée dans le mécanisme de compétence au travers de son action fratricide envers les cellules non compétentes (voir paragraphe II.C.iii). Toutefois, CbpD n'est pas suffisante au phénomène de fratricide. En l'absence de l'amidase LytA et de la muramidase LytC, seulement 0.4% des cellules cibles non compétentes sont détruites contre 33% des cellules pour une souche de pneumocoque de type sauvage (Eldholm et al., 2009). L'effet synergique entre CbpD et LytA semble provenir des dommages initiaux réalisés par CbpD au PG qui permettraient la libération de LytA à l'extérieur de la cellule

Bien que **LytC** possède une activité d'hydrolyse du PG *in vitro* (García et al., 1999), son ajout de façon exogène et à forte concentration n'a aucune incidence sur la croissance du pneumocoque (Eldholm et al., 2009). LytC possède un grand CBD N-terminal avec 11 unités répétées suivies par un domaine catalytique replié vers le CBD. Cette conformation est modifiée par la présence de PG qui permet de libérer l'accès au site actif. De plus, LytC clive préférentiellement des chaînes glycanes nues, dépourvue de chaînes peptidiques (Pérez-Dorado et al., 2010). Cette observation peut expliquer pourquoi l'action fratricide de LytC requiert la présence de CbpD (Eldholm et al., 2009). L'activité de LytC est par ailleurs régulée par la protéine CbpF, au travers d'un mécanisme qui reste à élucider (Molina et al., 2009).

Au cours de la compétence, la protection des cellules compétentes contre l'action des hydrolases fratricides provient du système de régulation à deux composants LiaFSR et de la protéine ComM (*spr1762*) (Eldholm et al., 2010b; Håvarstein et al., 2006). Les mécanismes sus-jacents ne sont pas connus mais pourraient faire intervenir un masquage du site de coupure des hydrolases par des protéines se fixant sur le PG, ou bien une modification du PG qui le protégerait de l'action des hydrolases (Guiral et al., 2005; Kausmally et al., 2005).

## 2. Hydrolases impliquées dans la division



**Figure 19** : Coupes de cellules observées en microscopie électronique (panneaux du haut) et images en contraste de phase (panneaux du bas) de cellules de pneumocoque sauvage ou de mutants *ΔdacA*, *ΔdacB*, *ΔpcsB*, *ΔlytB* ou *Δpmp23*. Barres d'échelle : 0.5 μm (microscopie électronique) et 2 μm (contraste de phase). D'après Abdullah et al., 2014; Barendt et al., 2011; De Las Rivas et al., 2002; Giefing et al., 2008; Pagliero et al., 2008; Rico-Lastres et al., 2015; Sham et al., 2011.

**DacA** est une D,D-carboxypeptidase qui génère des térapeptides qui ne peuvent pas être utilisés comme substrat de la réaction de transpeptidation catalysée par les PBP3 (Morlot et al., 2005). Elle est également nommée **PBP3** car son site actif lie les β-lactames. De manière intéressante, un rôle pour PBP3 dans la localisation de FtsZ et des PBP3 a été montré précédemment (Morlot et al., 2004). Cette observation, combinée à l'activité enzymatique de *DacA*, sa structure cristallographique, son profil de localisation et la morphologie anormale du mutant *ΔdacA* (Fig. 19), suggère un modèle dans lequel *DacA* régulerait l'assemblage des machineries de synthèse de la paroi et leur activité en modulant la disponibilité des chaînes pentapeptidiques, substrats des PBP3 (Schuster et al., 1990; Morlot et al., 2004, 2005).

**DacB** (*spr0554*) est une lipoprotéine ayant une putative activité L,D-carboxypeptidase, qui permet de transformer les térapeptides générés par *DacA* en tripeptides (Abdullah et al., 2014; Pribyl et al., 2014). La délétion du gène *dacB* conduit à une asymétrie du site de division, se traduisant par la présence de cellules très petites et rondes et de cellules allongées (Fig. 19) (Barendt et al., 2011).

Deux hydrolases, *PcsB* et *LytB*, sont impliquées dans la séparation des cellules. **PcsB** (Protein required for cell separation of group B streptococcus, *spr2021*) est une protéine sécrétée, initialement été identifiée chez *S. agalactiae* mais présente dans une grande variété de bactéries à Gram positif (Reinscheid et al., 2001). Chez *S. pneumoniae*, *PcsB* est également sécrétée mais une fraction des molécules reste associée à la membrane via une interaction

avec le complexe membranaire FtsE/FtsX qui la localise au niveau du septum (Mills et al., 2007; Sham et al., 2011). PcsB est une protéine essentielle, sa déplétion provoque des défauts de septation et de séparation des cellules, ainsi qu'une morphologie anormale (Fig. 19). PcsB possède un domaine N-terminal de type « coiled-coil » très allongé, suivi par un domaine CHAP qui pourrait avoir une activité amidase ou endopeptidase. La structure de PcsB a été résolue récemment sous la forme d'un dimère dans lequel les domaines CHAP sont partiellement occlus par une hélice du protomère opposé (Bartual et al., 2014). Un modèle d'action a été proposé dans lequel deux protomères positionnés de part et d'autre du septum s'assembleraient en un dimère inactif de PcsB. L'interaction avec FtsE/X induirait un changement conformationnel qui délogerait l'hélice occluant le domaine CHAP, permettant à PcsB de digérer le PG septal (Bartual et al., 2014).

**LytB** est la seconde hydrolase connue pour séparer les cellules filles, elle agit à la fin de la division. Les cellules *ΔlytB* forment de longues chaînes de cellules attachées à leurs extrémités par un fin segment de PG, hydrolysable par l'ajout de LytB recombinante (Fig. 19) (De Las Rivas et al., 2002; García et al., 1999). De plus, LytB se localise aux pôles de la bactérie, ce qui concorde avec un rôle tardif dans la séparation des cellules (De Las Rivas et al., 2002). Récemment deux études ont démontré que LytB est une glucosaminidase et ont résolu la structure de la protéine (Bai et al., 2014; Rico-Lastres et al., 2015). Rico-Lastres et al. ont par ailleurs montré que LytB digère le PG au niveau des résidus GlcNAc N-acétylés, avec une préférence pour les chaînes glycanes nues ou non réticulées (Rico-Lastres et al., 2015).

Récemment, l'hydrolase **MltG** a été découverte chez *E. coli*. Elle possède une activité transglycosylase lytique qui régule la longueur des chaînes glycanes (Yunck et al., 2015). MltG est retrouvée chez de nombreux organismes dont *S. pneumoniae*, chez qui elle serait un membre essentiel de la machinerie de synthèse de la paroi (Yunck et al., 2015).

**Pmp23** constitue une sixième hydrolase impliquée dans la division. Elle fut identifiée comme une hydrolase du PG grâce à la présence d'un domaine PECACE (Peptidoglycan carbohydrate cleavage enzyme) qui présentait une faible identité de séquence avec la transglycosylase lytique Slt70 d'*E. coli* et le lysozyme de type G (Pagliero et al., 2005). Bien qu'étant capable de digérer du PG de *Micrococcus luteus* lors d'une expérience de zymogramme (renaturation de protéine et digestion de peptidoglycane au sein d'un gel de polyacrylamide), son activité et sa spécificité envers le PG du pneumocoque n'ont jamais été

caractérisées en solution. La délétion du gène *pmp23* résulte en une sensibilité accrue aux  $\beta$ -lactames, une morphologie anormale et la présence de septa mal positionnés chez 30% de la population (Barendt et al., 2011; Pagliero et al., 2008) (Fig. 19). Les raisons de ces défauts morphologiques et sa fonction dans la division de *S. pneumoniae* n'étaient pas connus au départ de mon travail de thèse. Pmp23 est particulièrement intéressante car il s'agit de la seule hydrolase membranaire connue chez le pneumocoque. De ce fait, cette protéine possède une topologie idéale pour interagir avec d'autres protéines de la division ancrées dans la membrane.

### **3. Hydrolases de fonction inconnue**

Le génome de *S. pneumoniae* comprend pour 3 autres hydrolases putatives de fonction inconnue: les gènes *spr1875* et *spr0890* coderaient pour deux *N*-acetylmuramidases putatives et *spr0168* pour une L,D-carboxypeptidase putative (Barendt et al., 2011). La délétion des gènes codant pour ces protéines ne conduit pas à des défauts morphologiques, suggérant qu'elles ne sont pas impliquées dans la morphogénèse du pneumocoque, ou qu'elles possèdent des fonctions redondantes.

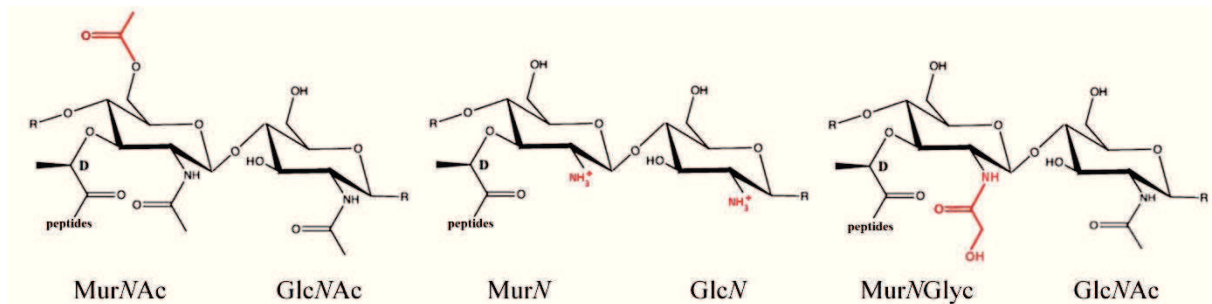
Parmi ces protéines, seule Spr1875 a été étudiée car elle pourrait être utilisée comme un nouvel antigène de surface pour le développement d'un vaccin. Lorsque des pneumocoques  $\Delta$ *spr1875* sont inoculées dans des souris, le taux de survie de ces souris est supérieur à celui de souris inoculées avec des cellules WT, suggérant un rôle dans la virulence pour Spr1875 (Cardaci et al., 2012; Peppoloni et al., 2013). Notons que l'expression du gène *spr1875*, comme celui de *pcsB* et de *lytB*, est régulée par le système à deux composants WalRK (VicRK), de fonction inconnue mais impliqué dans de nombreux processus cellulaires dont la virulence, la formation des biofilms, la tolérance au stress et la compétence chez de nombreuses espèces du genre *Streptococcus* (Ng et al., 2005; Senadheera et al., 2012, 2005; Winkler and Hoch, 2008).

### **iii. Modification des chaînes glycanes**

Un nombre important de modifications sont retrouvées dans le PG, notamment sur ses unités saccharidiques GlcNAc et MurNAc (Vollmer, 2008). Ces modifications sont souvent impliquées dans la résistance au lysozyme de l'hôte, mais peuvent aussi avoir un rôle dans la régulation des enzymes autolytiques. Il existe différents types de modifications telles que



l'acétylation, la déacétylation ou la glycolylation de différentes positions sur les unités saccharidiques.



**Figure 20** : Modifications covalentes du peptidoglycane : O-acétylation du MurNAc (gauche), N-déacétylation du MurNAc et du GlcNAc (milieu) et N-glycolylation du MurNAc (droite).

### 1. N-déacétylation

La glucosamine et l'acide muramique sont acétylés (CO-CH<sub>3</sub>) par défaut au niveau du carbone 2 (Fig. 20). L'analyse du PG de différentes bactéries révèle qu'une partie des sucres ne possède plus ce groupement acétyle mais porte une fonction NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. Chez *S. pneumoniae*, entre 40 et 80% des glucosamines et environ 10% des aides muramiques sont déacétylés. Cette réaction de N-déacétylation est catalysée au niveau du PG mature par l'enzyme membranaire PgdA. Cette protéine semble être unique dans le génome du pneumocoque car son absence résulte en un PG totalement N-acétylé (Vollmer and Tomasz, 2000). La protéine PgdA du pneumocoque comprend 3 domaines extracellulaires dont seul le domaine terminal déacétylase a une fonction connue. Les deux autres domaines ne sont pas retrouvés chez les autres membres de la famille de PgdA et pourraient être des domaines de régulation ou d'interaction avec les protéines de la paroi.

La N-déacétylation du GlcNAc et du MurNAc est une modification retrouvée chez les bactéries résistantes à l'action hydrolytique du lysozyme de l'hôte. Un mutant *ΔpgdA* (contenant un PG totalement acétylé) est plus sensible au lysozyme par rapport à une souche sauvage, probablement parce que la présence du groupement N-acétyle stabilise l'interaction du lysozyme avec son substrat (Vollmer and Tomasz, 2000). Une diminution de l'activité des hydrolases autolytiques LytA et LytC a en revanche été observée *in vitro* lorsque le PG est acétylé chimiquement (De Las Rivas et al., 2002; Vollmer and Tomasz, 2000). En ce qui concerne LytB, des résultats contradictoires existent car une première étude a montré que LytB digère de façon indifférenciée le PG acétylé ou déacétylé (De Las Rivas et al., 2002).

Une étude plus récente a montré la nécessité d'une N-acétylation de la glucosamine pour l'activité de LytB (Rico-Lastres et al., 2015).

La N-déacétylation pourrait enfin avoir un rôle lié à l'introduction de charges positives supplémentaires au sein du PG. Ces charges positives additionnelles pourraient aider à l'attachement de protéines à la paroi, et potentiellement limiter la diffusion de peptides antimicrobiens produits par le système immunitaire de l'hôte (Vollmer, 2008).

## 2. O-acétylation

Une O-acétylation du groupe hydroxyle présent sur le carbone 6 du MurNAc (Fig. 20) est trouvée chez de nombreuses bactéries à Gram positif comme *B. subtilis*, *S. aureus*, *Enterococcus hirae* ou *S. pneumoniae*, ainsi que chez certaines bactéries à Gram négatif telles que *Neisseria gonorrhoeae* ou *Helicobacter pylori*. La proportion de MurNAc O-acétylés varie 20 à 70% selon les espèces. La détection de cette modification est délicate car elle est souvent perdue lors de la purification du PG en vue de son analyse. Ainsi chez *S. pneumonie*, on ne la détecte que sur 8 % des MurNAc après purification du PG mais elle pourrait être présente dans une proportion plus importante dans le PG des cellules vivantes (Bui et al., 2012).

Il n'existe pas de données expérimentales montrant l'existence de lipide II O-acétylé. L'O-acétylation survient donc probablement après l'insertion du lipide II dans le PG préexistant. Il existe deux catégories d'enzymes responsables de la O-acétylation: la famille de OatA (O-acetylated transferase A) et celle de Ape/Pat (O-acetylpeptidoglycan esterase / Peptidoglycan O-acetyltransferase) (Weadge and Clarke, 2006). Le gène *adr* du pneumocoque est homologue à celui qui code pour OatA et son altération résulte en une sensibilité accrue au lysozyme et aux antibiotiques (Crisostomo et al., 2006).

De façon générale, l'O-acétylation inhibe les activités des hydrolases qui clivent les chaînes de sucres (Bera et al., 2007; Clarke and Dupont, 1992; Dupont and Clarke, 1991). En particulier, la présence du groupement O-acétyle masque l'hydroxyle porté par le carbone 6 et utilisé par les transglycosylases lytiques pour cliver la liaison  $\beta$ -1,4 entre le MurNAc et le GlcNAc (Vollmer, 2008). En empêchant cette réaction, la O-acétylation va avoir un impact sur la longueur des chaînes glycanes et jouer un rôle dans la morphogénèse bactérienne (Veyrier et al., 2013). L'O-acétylation pourrait en outre introduire une gêne stérique pour le positionnement du résidu MurNAc dans le site actif des hydrolases.

### 3 *N*-glycolylation

La *N*-glycolylation est une modification retrouvée chez certaines espèces bactériennes, principalement des mycobactéries, sur les résidus MurNAc (Fig. 20). Elle introduit un groupe hydroxyle additionnel sur le groupe *N*-acetyl présent en position C2. Elle est catalysée par une hydroxylase NADPH-dépendante pendant la synthèse du lipide II. Le rôle précis de cette modification est inconnu mais elle est impliquée dans la stabilité de la paroi et dans la résistance au lysozyme, comme la N-déactetylation et la O-acétylation (Vollmer, 2008).

## IV. Microscopie optique de fluorescence

### A. Généralités

#### i. Historique

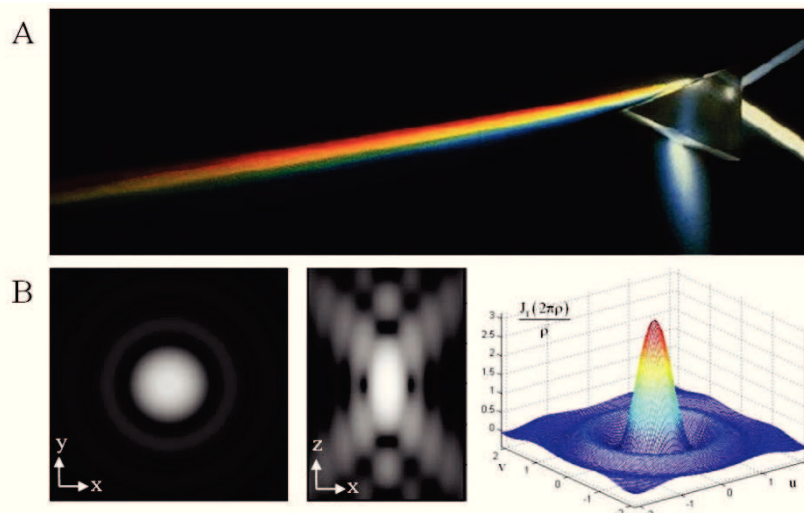
La microscopie optique a révolutionné l'étude de la biologie et reste aujourd'hui un outil privilégié des biologistes. La valeur du microscope en biologie fut démontrée très tôt, notamment au travers de la description des cellules eucaryotes en 1665 par Robert Hooke et en 1674 de celle des bactéries par Antonie Van Leeuwenhoek. Ces deux chercheurs inventèrent des instruments très ingénieux pour l'époque (Fig. 21).



**Figure 21** : exemple de spécimen de microscope développé par Robert Hooke et Antonie Van Leeuwenhoek. (source : [micro.magnet.fsu.edu/](http://micro.magnet.fsu.edu/))

## ii. Principes fondamentaux et limite de résolution

La lumière visible est l'ensemble d'ondes électromagnétiques perçues par la vision humaine ; elle est caractérisée par une ou plusieurs longueurs d'onde comprises dans le spectre visible (400-780 nm) (Fig. 22.A). Du fait de la nature ondulatoire de la lumière, la résolution optique est limitée par la diffraction de la lumière. Ce phénomène est facilement identifiable en prenant une source de lumière ponctuelle qui traverse une lentille sphérique. L'image de cette source est une tache de diffraction de forme concentrique avec un disque central entouré par une répétition d'ondes de propagation. Ce type de tache est connu sur le nom de tache de diffraction d'Airy (Fig. 22.B). Ce signal peut être décrit par une fonction de distribution mathématique appelée fonction d'étalement du point ou PSF (Point Spread Function).



**Figure 22** : A) dispersion de la lumière blanche à travers un prisme (source : NASA). B) Disque d'Airy selon l'axe X/Y et représentation 3D d'un disque d'Airy. (source : cours de M. Gromova, UJF)

Le physicien Ernst Karl Abbe s'intéressa au pouvoir de résolution des microscopes optiques (en lumière visible). Il montra que dans un échantillon donné, les détails les plus fins que l'on peut obtenir sur sa structure ont une taille  $D$  avec

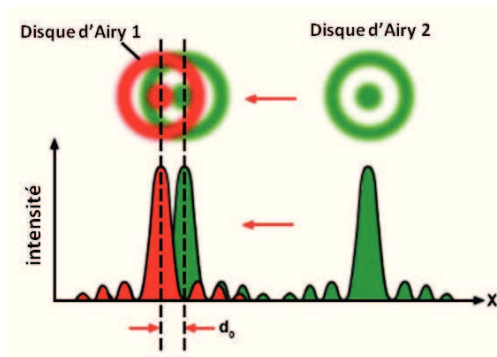
$$D = \frac{\lambda}{2 n \sin (\alpha)} = \frac{\lambda}{2 NA}$$

où  $\lambda$  est la longueur d'onde utilisée,  $n$  l'indice de réfraction du milieu de montage (pour l'air  $n=1$ ) et  $\alpha$  est le demi-angle d'ouverture du microscope. Aujourd'hui, cette formule est simplifiée par l'utilisation de l'ouverture numérique (NA) de l'objectif, qui correspond à la multiplication de l'indice de réfraction par le sinus du demi-angle.

La notion de résolution en microscopie peut se baser sur d'autres critères, bien que l'équation finale ressemble à celle d'Ernst Abbe. Le critère de Rayleigh stipule que pour que deux points soient résolus dans un plan image, il faut qu'ils soient séparés d'une distance au moins égale au rayon d'un disque d'Airy (soit la distance entre le centre et le 1<sup>er</sup> minimum du disque d'Airy) (Fig. 23). L'équation résultante est la suivante :

$$D = \frac{1.22\lambda}{2 n \sin(\alpha)} = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$

D étant la distance de séparation minimale pour que deux objets puissent être résolus individuellement.



**Figure 23** : Deux disques d'Airy et leurs projections 2D. Le critère de Rayleigh est défini par la distance minimale  $d_0$  qui permet de définir 2 points indépendants (voir texte). Le 1<sup>er</sup> minimum correspond au premier minimum d'intensité à partir du centre du cercle. D'après [zeiss.campus.magnet.fsu.edu](http://zeiss.campus.magnet.fsu.edu)

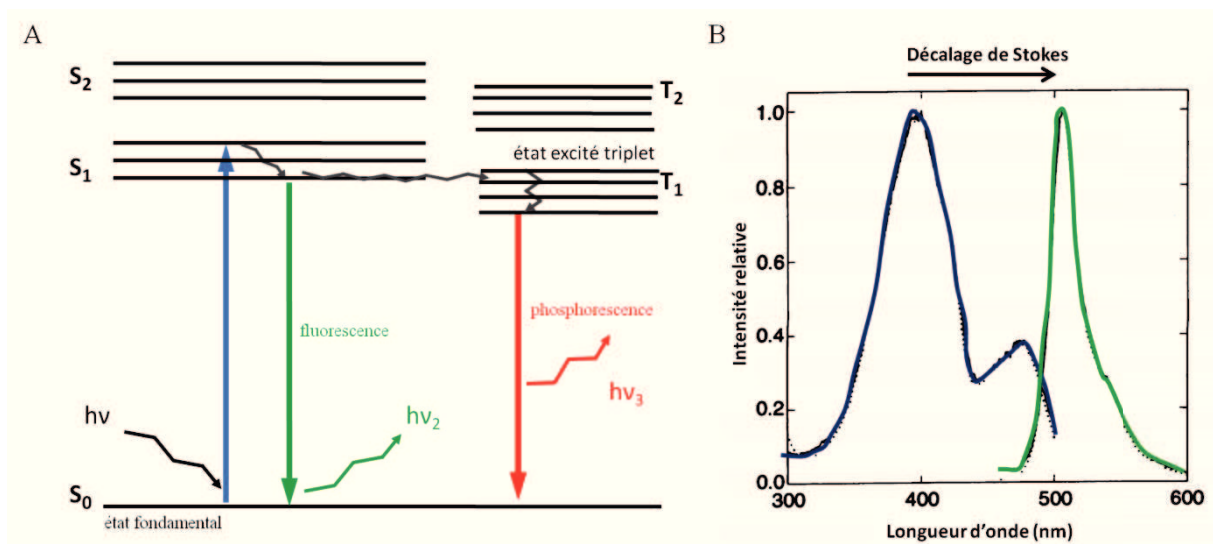
La résolution des microscopes est donc dépendante de deux critères : la longueur d'onde  $\lambda$  et l'ouverture numérique NA. En microscopie optique, les fluorophores communément utilisés ont un maximum de longueur d'onde d'émission situé entre 450 et 600 nm. La résolution n'est que peu améliorée par un choix différent de fluorophore.

L'ouverture numérique des microscopes dépend de l'objectif utilisé et du milieu de montage. Pour les objectifs à air, l'ouverture numérique est théoriquement au maximum proche de 1 (avec  $n=1$  et  $\alpha=90^\circ$ ). Cependant, il n'est pas possible d'obtenir un demi-angle d'ouverture aussi important et les objectifs à air peuvent atteindre des ouvertures numériques situées entre 0.85 ( $\alpha= 60^\circ$ ) et 0.95 ( $\alpha= 72^\circ$ ). Avec les objectifs à immersion (huile, eau), l'indice de réfraction du milieu est supérieur ( $n \geq 1.33$ ), permettant une ouverture numérique supérieure. Avec un objectif à huile, la limite de résolution typiquement admise est de 250 nm ( $\lambda = 500-600$  nm et  $NA = 1.4$ ), ce qui représente une valeur du même ordre de grandeur que la taille de la plupart des bactéries (1-4  $\mu\text{m}$ ) et des virus (100-200 nm).

### iii. Fluorescence

La luminescence est définie comme l'émission de tout rayonnement qui n'est pas d'origine purement thermique. L'émission peut être provoquée de plusieurs manières comme par exemple chimiquement (chimioluminescence), thermiquement (thermoluminescence) ou en utilisant une source lumineuse (phosphorescence / fluorescence). Nous nous intéresserons plus particulièrement à cette dernière.

Si nous considérons une molécule fluorescente (un fluorophore), celle-ci peut se trouver dans plusieurs états et niveaux d'énergie. En absorbant de l'énergie (un photon d'énergie  $h\nu$  et de fréquence  $\nu$ ), on affecte les états électroniques de la molécule et on permet à des électrons de passer d'un état fondamental  $S_0$  à un état excité  $S_{n>0}$  (Fig. 24.A, flèche bleue). Ce premier état a une durée de vie très courte et se relaxe jusqu'au plus bas niveau vibrationnel de l'état excité  $S_1$ . Dans un second temps, une relaxation de la molécule apparaît soit par un retour direct à l'état fondamental, on parle dans ce cas de fluorescence, soit par un croisement intersystème vers un état excité triplet, on parle dans ce cas de phosphorescence (Fig. 24.A). Dans tout les cas, le photon émis a une énergie moindre que celui d'excitation. Ainsi, les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence seront différents, avec un décalage vers une longueur d'onde plus grande (i.e. décalage de Stokes) (Fig. 24.B).



**Figure 24 :** A) diagramme de Jablonski simplifié ( $h\nu$  : photon d'excitation,  $h\nu_2$  : photon d'émission (fluorescence),  $h\nu_3$  : photon d'émission (phosphorescence) et B) spectre d'excitation et d'émission de la GFP d'après (Chalfie et al., 1994).

Avec le temps et l'intensité d'irradiation d'un échantillon, on peut observer une extinction progressive et irréversible de la fluorescence. Ce phénomène est appelé photoblanchiment. A l'échelle moléculaire, ce phénomène n'est pas complètement compris. Par exemple, il pourrait être la conséquence d'un transfert d'énergie entre l'état excité triplet du fluorophore et une molécule de dioxygène ( $O_2$ ) pour conduire cette dernière dans un état électronique excité communément appelé oxygène singulet ( $^1O_2$ ). Cette molécule d'oxygène singulet est une espèce réactive de l'oxygène (ROS) très électrophile qui peut donc réagir chimiquement avec son environnement proche. Cette réaction va former des altérations irréversibles du fluorophore qui ne pourra plus fluorescer (Diaspro et al., 2006). L'étude de la protéine fluorescente phototransformable IrisFP a par ailleurs montré qu'à faible illumination, un glutamate proche du fluorophore subit une décarboxylation qui entraîne un réarrangement moléculaire entraînant la perte de fluorescence (Duan et al., 2013). Certaines techniques de microscopies tirent profit de ce phénomène comme la technique de FRAP qui mesure la diffusion des protéines marquées par le retour de fluorescence dans la zone qui a été photoblanchie. Le photoblanchiment est nécessaire à certaines techniques de microscopie ultra-résolue détecter les molécules sur un nombre limité d'images (PALM/STORM, voir section suivante).

## **B. Nouvelles techniques d'imagerie super-résolue**

Dans les dernières années, un nombre important de techniques de microscopie super-résolue ont été inventées, permettant de dépasser la limite de résolution due à la diffraction de la lumière (Hell, 2007). Parmi ces techniques de super-résolution, trois types de techniques sont communément utilisées. Les caractéristiques de chaque technique sont résumées dans le tableau 4.

Technologie	Résolution (nm)	Illumination	Sondes	Temps d'acquisition	Traitement post-acquisition	Taille des données
microscopie conventionnelle	250	Champ large, TIRF, confocal	Conventionnelles	Court (secondes)	Non	Petit (1 image)
PALM/STORM	10	Champ large, TIRF	Marqueurs/Protéines phototransformables	Long (minutes)	Oui (identification du centre du signal)	Grand (plus de 2 000 images)
SIM	100	Champ large, TIRF	Conventionnelles	Court (secondes)	Oui (transformée de Fourier)	Petit (9-15 images)
STED	30	balayage laser	Conventionnelles	Court (secondes)	Oui (généralement déconvolution)	Petit (1 image)
RESOLFT	30	balayage laser	Sondes ou protéines phototransformables	Court (secondes)	Oui (généralement déconvolution)	Petit (1 image)

**Tableau 4** : caractéristiques de différentes techniques de microscopie super-résolue. Inspiré de (Thorley et al., 2014).

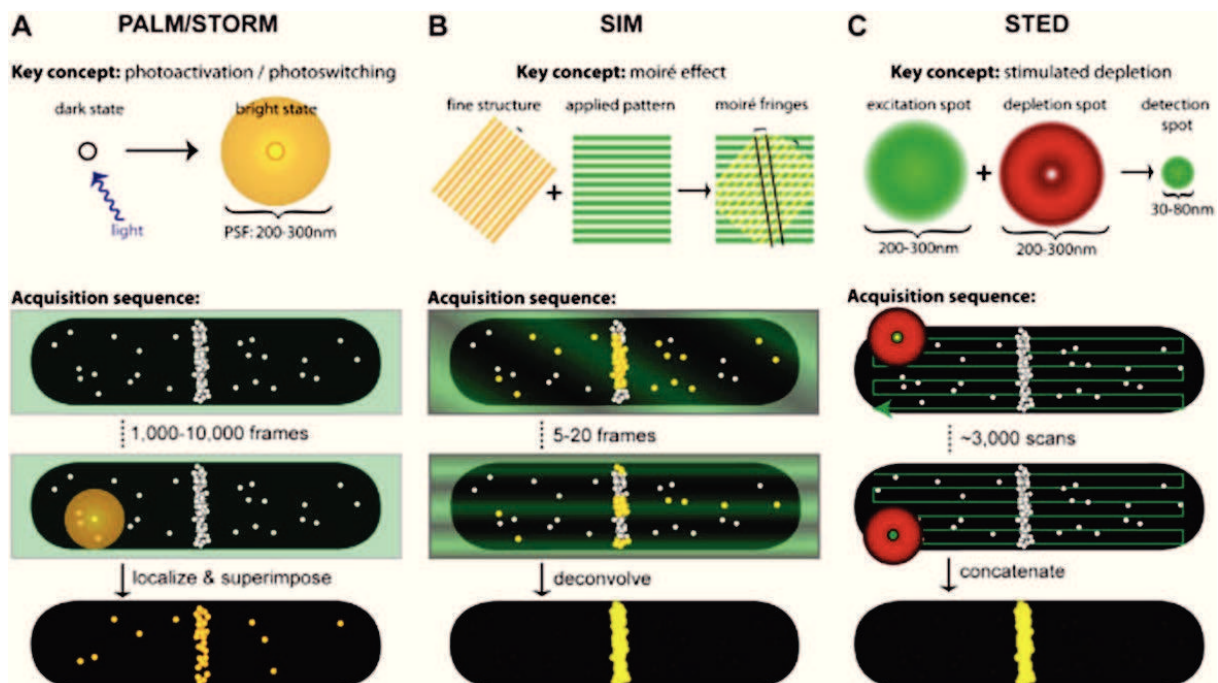
La première catégorie de techniques nécessite l'utilisation de marqueurs organiques ou de protéines phototransformables pour imager et localiser des molécules uniques. Cette technique a été développée sur la base du même principe fondamental par trois groupes qui, indépendamment, l'ont appelé « STochastic Optical Reconstruction Microscopy » (STORM) (Rust et al., 2006), « fluorescence PhotoActivated Localization Microscopy » (fPALM) (Hess et al., 2006) ou « PhotoActivated Localization Microscopy » (PALM) (Betzig et al., 2006) (Fig. 25.A). Cette catégorie de techniques sera détaillée dans la section suivante.

La seconde catégorie est constituée de la microscopie de type « Structured Illumination Microscopy » (SIM), une technique d'illumination structurée de l'échantillon qui se base sur les motifs d'interférences (effet de moiré) créés lors de la superposition de deux motifs (Fig. 25.B) (Gustafsson, 2000). En microscopie SIM, l'un des motifs structurés correspond à une illumination périodique choisie et connue (Fig. 25.B, carré vert) et l'autre motif correspond au motif de fluorescence inconnu de l'échantillon (Fig. 25.B, carré orange). En utilisant les motifs d'interférences enregistrés (Fig. 25.B, lignes noires) et la connaissance du motif d'illumination (Fig. 25, carré vert), il est possible de reconstruire la structure de l'échantillon à une résolution d'environ 100 nm (Fig. 25.B).

La dernière catégorie comprend les techniques de « REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions » (RESOLFT) et de « Stimulated Emission Depletion » (STED). Dans ces techniques, la région d'observation est illuminée de façon spécifique pour créer une



PSF « ingénierée ». En pratique, deux sources de lasers synchronisées sont utilisées. Elles consistent en l'illumination d'un faisceau laser d'excitation (Fig. 25.C, excitation spot) suivi immédiatement par l'illumination par un faisceau laser de déplétion en forme de donut (nommé faisceau STED) (Fig. 25.C, depletion spot). Lorsque l'échantillon est illuminé, les fluorophores vont être excités mais ceux exposés au faisceau STED sont retransférés à l'état fondamental sans fluorescence, grâce au phénomène d'émission stimulée. Seul les fluorophores présents au centre du faisceau STED (dans le centre du donut, Fig. 25.C, detection spot) peuvent fluorescer, ce qui donne une PSF ingénierée augmentant la résolution spatiale jusqu'à 30 nm environ. Le principe du RESOLFT est similaire mais se base sur l'utilisation de fluorophores phototransformables pour les empêcher de fluorescer.



**Figure 25** : microscopie super-résolue basée sur A) la détection de molécules uniques (PALM/STORM), B) l'illumination structurée et l'effet moiré (SIM) ou C) l'émission stimulée (STED). voir texte pour détails. D'après (Coltharp and Xiao, 2012).

## C. Microscopie PALM/STORM

### i. Principes

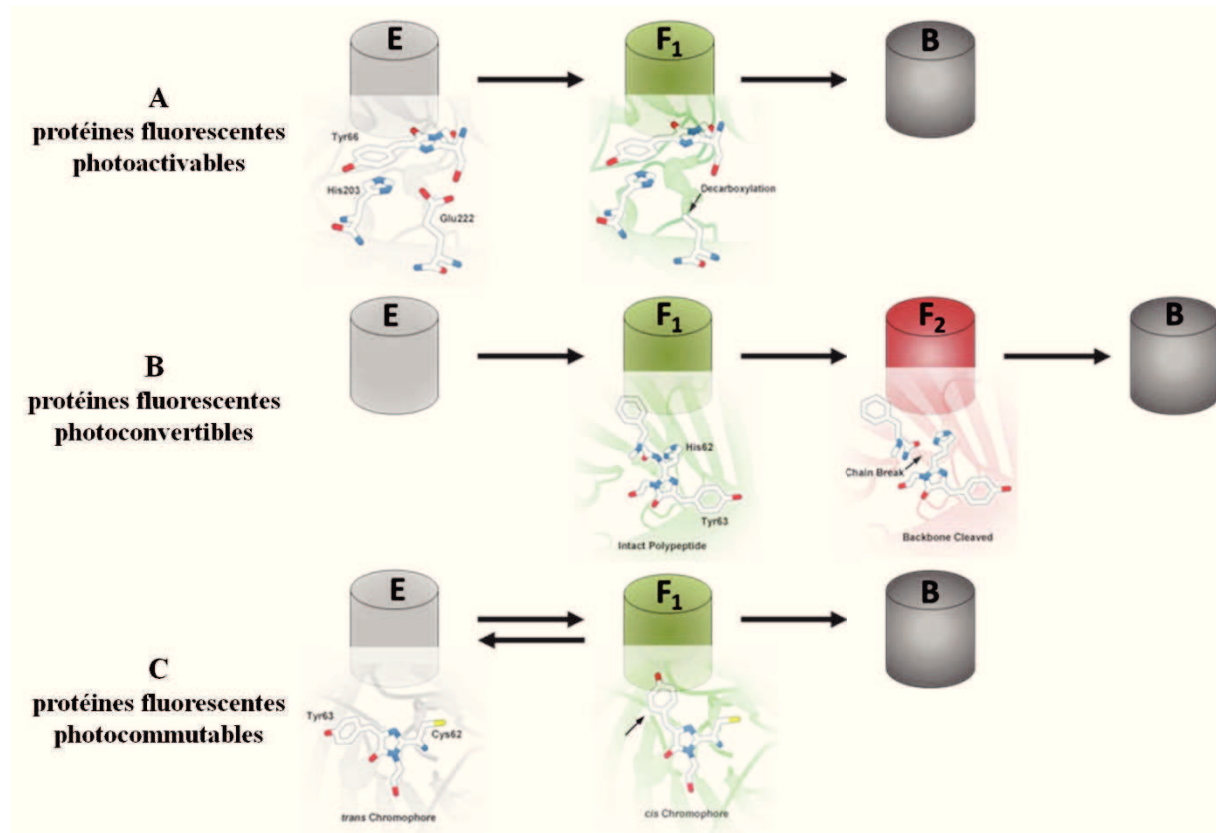
L'imagerie de molécules individuelles est devenue possible grâce à la découverte et la création de fluorophores dont les spectres d'excitation et d'émission sont modifiables par illumination. La différence notable entre le PALM et le STORM est l'utilisation de protéines

fluorescentes pour le premier et de sondes organiques ou synthétiques pour le second. Nous nous intéresserons plus particulièrement ici au PALM, tout en sachant que la plupart des informations fournies s'appliquent également au STORM.

Il existe trois catégories de protéines phototransformables (PTFPs ou « PhotoTransformable Fluorescent Proteins ») utilisés en PALM: les protéines photoactivables, les protéines photoconvertibles et les protéines photocommutables. Le principe général est le même pour toutes ces catégories. Contrairement aux fluorophores organiques, les protéines fluorescentes photoactivables ne peuvent pas émettre de la fluorescence à l'état initial (état non fluorescent « E », Fig. 26.A); elles doivent être illuminées à une longueur d'onde proche des ultraviolets pour passer dans un état activé. Au niveau moléculaire, cette étape est réalisée généralement par la décarboxylation d'un acide glutamique très conservé (Glu 222) proche du chromophore. Suite à la décarboxylation, le chromophore passe d'un état neutre à un état anionique (excitable). Dans cet état photo-activé, les fluorophores émettent un signal fluorescent lorsqu'ils sont excités à la longueur d'onde d'excitation de fluorescence (état fluorescent « F », Fig. 26.A). L'état fluorescent persistera jusqu'à ce que la molécule photoblanchisse (état « B », Fig. 26.A). Dans le cas des protéines photoconvertibles, l'illumination ultraviolette provoque la modification du spectre d'émission/excitation de manière irréversible par le clivage d'une liaison peptidique modifiant la conformation du chromophore (passage de l'état « F<sub>1</sub> » à l'état « F<sub>2</sub> », Fig. 26.B). Alors que les deux premiers types de protéines subissent des modifications irréversibles, les protéines photocommutables passent d'un état fluorescent à un état non fluorescent produit par un changement d'isomérisation du chromophore d'un état *cis* (fluorescent) à un état *trans* (non fluorescent) lors de l'excitation du chromophore (Fig. 26.C). Elles peuvent également revenir de l'état non fluorescent à l'état fluorescent sous illumination ultraviolette.

Un exemple de protéines phototransformables est la protéine Dendra2. Dendra2 est une protéine photoconvertible provenant d'une version améliorée de la protéine Dendra, elle-même issue de la protéine dendGFP de l'espèce de corail *Dendronephthya sp.* Dendra fut améliorée en générant un variant monomérique de dendGFP et Dendra2 porte la mutation A224V, permettant une meilleure maturation du chromophore et une meilleure fluorescence (Chudakov et al., 2007; Gurskaya et al., 2006). Dendra2 possède deux états fluorescents : vert (longueurs d'ondes d'excitation / émission : 490 nm/507 nm) et rouge (553 nm/573 nm). Elle a de nombreux avantages pour l'étiquetage des protéines d'intérêt biologiques car il s'agit

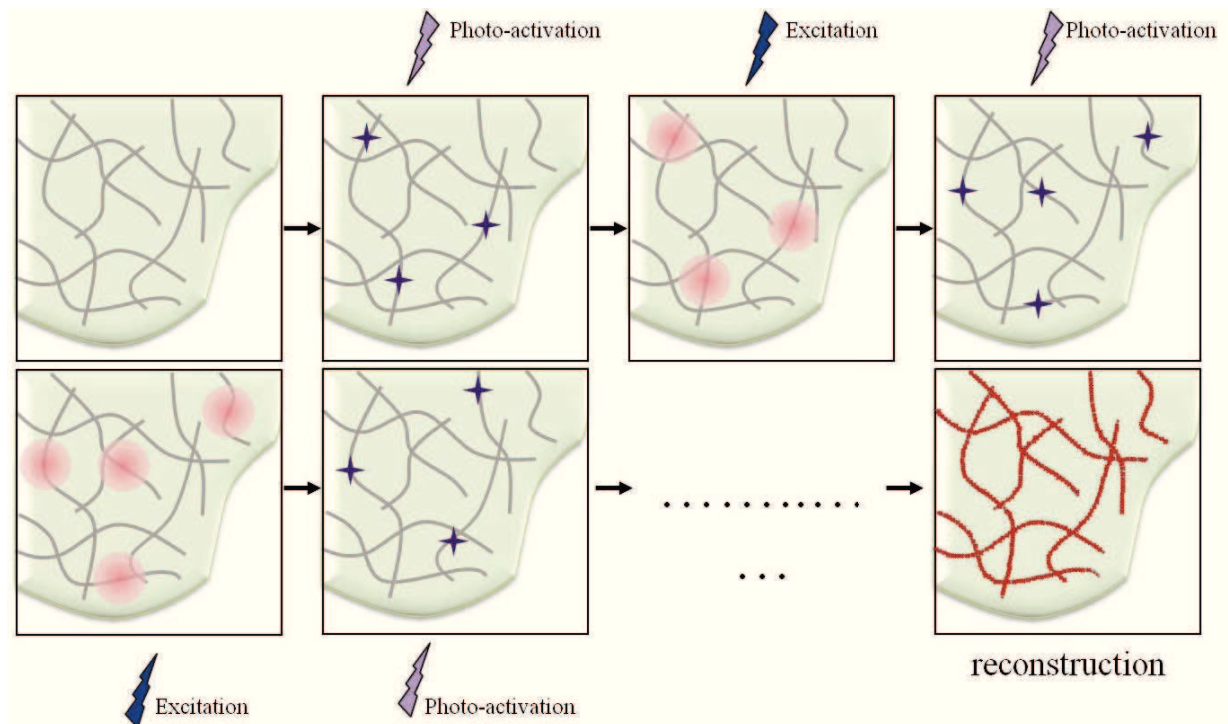
d'une protéine monomérique mûrant efficacement à 37°C, avec une fluorescence importante et démontrant une forte photostabilité dans l'état activé (Chudakov et al., 2007).



**Figure 26 :** Les différentes protéines fluorescentes utilisées en microscopie de super-résolution par localisation : A) photoactivables, B) photoconvertibles et C) photoconvertibles. Les modifications au niveau du chromophore sont visualisées en dessous et indiquées par une flèche (décarboxylation, rupture de liaison ou isomérisation cis-trans). E, état non fluorescent ; F<sub>1</sub>, état fluorescent ; F<sub>2</sub>, état fluorescent photoconverti ; B, état photoblanchi. Modification du chromophore d'après [zeiss-campus.magnet.fsu.edu](http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu).

En microscopie conventionnelle, tous les fluorophores présents dans le champ de microscopie émettent un signal fluorescent de façon simultanée, résultant en une multitude de signaux chevauchants qui ne peuvent être résolus si la distance qui les sépare est inférieure à 200-300 nm. Dans les techniques d'imagerie de molécules uniques (PALM/STORM), la fluorescence de chaque fluorophore est excitée de façon individuelle grâce à une modulation entre un état neutre non fluorescent et un état excitable en fluorescence. Ainsi, aucun signal fluorescent ne se chevauchera. La position des molécules sera généralement déterminée en traduisant le signal fluorescent (qui correspond à la PSF du microscope) par une fonction gaussienne qui permet de déterminer la position centrale du signal et ainsi localiser la molécule. La précision de localisation dépend de la déviation standard de la PSF et du nombre de photons émis. Ce processus est réitéré jusqu'à ce que la structure étudiée soit suffisamment échantillonnée ou qu'il n'y ait plus de molécules phototransformables excitables dans l'échantillon (Fig. 27). La taille des pixels des caméras actuelles et le nombre de photons émis

par les protéines phototransformables permettent à ce jour d'obtenir une précision de localisation de l'ordre de 20 nm.



**Figure 27** : principe de la microscopie de localisation de molécules uniques STORM/PALM. Une partie des molécules est phototransformée (étoiles violettes) par un laser ultraviolet (éclair violet). Sous l'impulsion d'une lumière d'excitation (éclair bleu), ces molécules émettent un signal fluorescent (cercle rouge) avant d'être photoblanchies. Ces étapes sont répétées jusqu'à épuisement des protéines localisables. Une image de la structure protéique étudiée est finalement reconstruite (dernier panneau) par localisation des centres des signaux fluorescents. Sa résolution pourra atteindre 20 nm.

## ii. Applications chez les bactéries

La taille d'une bactérie est de l'ordre du  $\mu\text{m}$  et les processus clefs du métabolisme bactérien sont effectués par des complexes moléculaires dont les dimensions sont de l'ordre de la dizaine à la centaine de nanomètres. Les limites imposées par la diffraction de la lumière rendent donc les études en microscopie difficiles au regard des dimensions de la cellule et de ses complexes protéiques. L'avènement de la microscopie de localisation de molécules uniques a permis de repousser les limites de résolution d'imagerie et d'ouvrir de nouvelles perspectives d'observation des assemblages protéiques dans la cellule bactérienne. La première étude de microscopie en molécules uniques chez les bactéries s'est intéressée à la chimiotaxie chez *E. coli* en localisant trois protéines impliquées dans la transduction du signal vers le moteur flagellaire (CheW, CheY et Tar) (Greenfield et al., 2009). Alors qu'en microscopie conventionnelle ces protéines cytoplasmiques montrent une localisation diffuse et homogène aux niveaux des pôles de la cellule, leur imagerie en microscopie super-résolue a

montré qu'elles s'assemblent sous la forme d'amas (« clusters ») hétérogènes localisés aux pôles.

La majorité des autres études se sont intéressées soit à l'ADN bactérien soit à la division cellulaire, deux sujets fondamentaux dans l'étude des bactéries. Un certain nombre d'études PALM se sont intéressées à la localisation des protéines associées au nucléoïde (HU (Lee et al., 2011), H-NS (Wang et al., 2011) ou MukBEF (Badrinarayanan et al., 2012)) et ont permis de mieux comprendre l'organisation des protéines impliquées dans la régulation de l'expression des gènes ou dans la maintenance de la structure du chromosome chez *E. coli*. Une autre étude très complète a permis de décrire la nano-structure et la dynamique *in vivo* de la protéine SpoIIIE, une translocase impliquée dans la ségrégation de l'ADN dans la spore chez *B. subtilis*. Des études réalisées sur cellules vivantes ont permis de suivre la localisation de SpoIIIE dans le temps et dans l'espace. Le signal de fluorescence d'une même molécule a été enregistré et localisé sur plusieurs images consécutives pour déterminer le mouvement de la protéine dans la cellule vivante. Cette étude a ainsi montré que SpoIIIE est retrouvé sous deux formes d'amas (« clusters ») caractérisé par rapport à leurs propriétés de diffusion. La première forme d'amas est dynamique composée de protéines qui se déplacent le long de la membrane cytoplasmique dans la partie cylindrique du bacille. Dans le second type d'amas, SpoIIIE prend la forme d'un amas d'une taille de 45 nm qui présente une mobilité réduite présent majoritairement au site de septation lors de la division ou de la sporulation (Fiche et al., 2013). Grâce à la combinaison de plusieurs techniques de microscopie ultra-résolue (PALM, 3D-SIM et scanning Number and Brightness analysis), les auteurs ont ensuite montré que les amas de SpoIIIE contiennent des hexamères présents au site de septation en croissance végétative, et à l'interface entre la spore et la cellule mère au cours de la sporulation (Cattoni et al., 2014; Fiche et al., 2013). Par double marquage de SpoIIIE et de la membrane, ils ont déterminé le positionnement de SpoIIIE par rapport à la membrane de la cellule mère, et ainsi montré que SpoIIIE est positionnée dans le compartiment de la cellule mère. Ces données ont permis d'établir un modèle sur le fonctionnement de SpoIIIE pour la translocation de l'ADN dans la préspore lors de la sporulation (Fiche et al., 2013).

La microscopie super-résolue a également apporté des informations importantes sur les protéines du cytosquelette bactérien et en particulier sur FtsZ. L'étude de l'anneau Z en PALM a révélé une structure granulaire hétérogène et probablement non continue chez *E. coli* et *C. crescentus* (Fu et al., 2010; Holden et al., 2014). Ces études ont été décrites dans le sous-paragraphe III.B.ii.2.

D'autres études ayant utilisé la microscopie de localisation de molécules uniques sont résumées dans les deux revues suivantes : (Cattoni et al., 2012; Coltharp and Xiao, 2012).

### **iii. Artefacts en microscopie à molécules uniques**

En microscopie à fluorescence conventionnelle, la perte d'information sur une petite échelle n'aura pas d'influence sur le résultat final car la superposition des signaux couvre les défauts sur l'ensemble du signal. Dans le cas du STORM/PALM, la préservation des structures cellulaires est un point crucial car chaque défaut de fluorescence aura une résonance sur les détails de la structure finale reconstruite. Or ces études n'ont pas encore de référence qui peuvent permettre une comparaison entre les données. Elles nécessitent donc d'avoir une vigilance d'autant plus importante sur l'interprétation des données par rapport à la qualité de l'échantillon ou au traitement post acquisition.

La qualité de l'échantillon va dépendre de nombreux paramètres. Nous détaillerons deux points dans ce paragraphe: le respect des structures cellulaires lors de la fixation des cellules et les artefacts qui peuvent survenir par l'utilisation des sondes fluorescentes. L'acquisition de données sur cellules vivantes est compliquée par la contrainte liée au temps nécessaire à l'acquisition des milliers d'images de molécules uniques. En conséquence, la plupart des études de PALM/STORM sont réalisées sur cellules fixées. La fixation est un traitement qui peut altérer l'ensemble de la structure cellulaire et qui ne s'effectue pas de façon instantanée sur l'ensemble de la cellule (Annibale et al., 2012; Tanaka et al., 2010). De plus, les conditions de fixation optimales sont dépendantes de la structure observée (démontré pour les structures eucaryotiques, Whelan et Bell, 2015). Ces contraintes vont nécessiter le test de nombreuses conditions pour respecter la structure macromoléculaire étudiée *in vivo* et optimiser sa détection en PALM/STORM. Si possible, il sera utile de vérifier les observations obtenues par différentes méthodes d'imageries ou de fixation.

En STORM, la taille des complexes antigène-anticorps (anticorps monoclonal primaire + secondaire: 2 x 10-15 nm) diminue la précision de localisation de l'antigène, l'utilisation d'anticorps peut entraîner un marquage aspécifique et la structure observée peut varier en fonction de la concentration d'anticorps utilisée (Whelan and Bell, 2015). L'utilisation des PTFPs, en PALM, n'est pas exempte d'artefacts. La distance relative entre l'étiquette fluorescente et la protéine est au minimum de la taille de la sonde (protéine fluorescente + linker: 4 nm + 1-2 nm). De plus, le signal est retrouvé dans l'ensemble des

directions autour de la protéine d'intérêt. Cette distance signal-protéine d'intérêt introduit un biais qui augmente artificiellement la taille des structures observées ou qui altère le résultats des études de co-localisations (Shivanandan et al., 2014).

Dans la cellule, le repliement des fluorophores n'est pas totalement efficace, il est de l'ordre de 80% pour la GFP, se traduisant par une perte modérée de fluorescence en microscopie conventionnelle. Dans le cas des PTFPs, un repliement incomplet des fluorophores va avoir un effet direct sur le nombre de protéines localisées. L'efficacité de repliement est estimée entre 40% et 60% pour différentes PTFPs (Durisic et al., 2014) et ces valeurs varient en fonction de l'organisme dans lequel est exprimée la protéine fluorescente. Par exemple, alors que 45% des fluorophores PAmCherry sont capables de fluorescer dans l'oocyte du xénope (Durisic et al., 2014), ce chiffre tombe à 4% chez *E. coli* (Wang et al., 2014) en absence d'optimisation de codons pour l'expression chez cette bactérie. En conséquence, la protéine marquée est sous-échantillonnée, ce qui a des conséquences importantes pour la qualité de reconstruction et la fiabilité des structures observées (forme, continuité, homogénéité, aspect quantitatif).

Le traitement des signaux fluorescents pour localiser les molécules est la seconde source principale d'artefacts et elle est directement liée à la qualité de l'acquisition. Des générateurs d'artefacts importants sont les vibrations causées par le microscope (par exemple, ouverture/fermeture des obturateurs) ou par l'environnement du microscope (ventilation, réfrigérateur, vibration causée par l'expérimentateur). Ces artefacts peuvent être quasiment éliminés par l'utilisation de tables optiques à réduction de vibrations et de stabilisateurs d'optique. Un autre phénomène physique qui altère la qualité de l'image est la dérive, généralement engendrée par des phénomènes d'expansion et de relaxation du milieu liés à des changements de température au sein des matériaux. Les premières mesures pour contrer ce phénomène sont la stabilisation de la température de la pièce et/ou l'installation d'une chambre à température contrôlée sur le microscope. Toutefois, ces mesures peuvent rester insuffisantes pour la microscopie à molécules uniques et il faut généralement utiliser un stabilisateur physique ou un système de correction actif, basé sur l'introduction de billes fluorescentes servant de références spatiales dans le champ observé.

Lors de l'observation de protéines fluorescentes, on s'aperçoit que la fluorescence n'est pas constante dans le temps, alternant entre des états allumés et éteints. Ce phénomène est appelé le scintillement (« blinking ») et peut avoir pour conséquences un

surdénombrement d'une même molécule et la détection artificielle de clusters protéiques. Ce même problème est retrouvé si la fluorescence d'une sonde persiste sur plusieurs images consécutives. Cependant, de nombreux logiciels permettent de prendre en compte les paramètres de scintillement de la protéine et de supprimer des molécules qui seraient imagées sur un trop grand nombre d'images.

Les techniques de microscopie de localisation de molécules uniques nécessitent d'évaluer correctement la qualité d'une image reconstruite super-résolue. La prise en compte des paramètres de fixation de l'échantillon, des caractéristiques photophysiques de la sonde et des conditions d'expérimentation est très importante. De plus, il existe un grand nombre de logiciels de reconstruction, chacun se basant sur différents algorithmes et méthodes pour reconnaître le signal fluorescent, le traiter et déterminer la position des molécules (Sage et al., 2015). L'observation des données brutes et la compréhension des paramètres de reconstruction des logiciels sont indispensables à l'expérimentateur pour évaluer la qualité de la reconstruction et la pertinence des informations générées par l'étude PALM/STORM.



# *Matériels et Méthodes*

---

## **Culture de *S. pneumoniae* et méthodes de fixation**

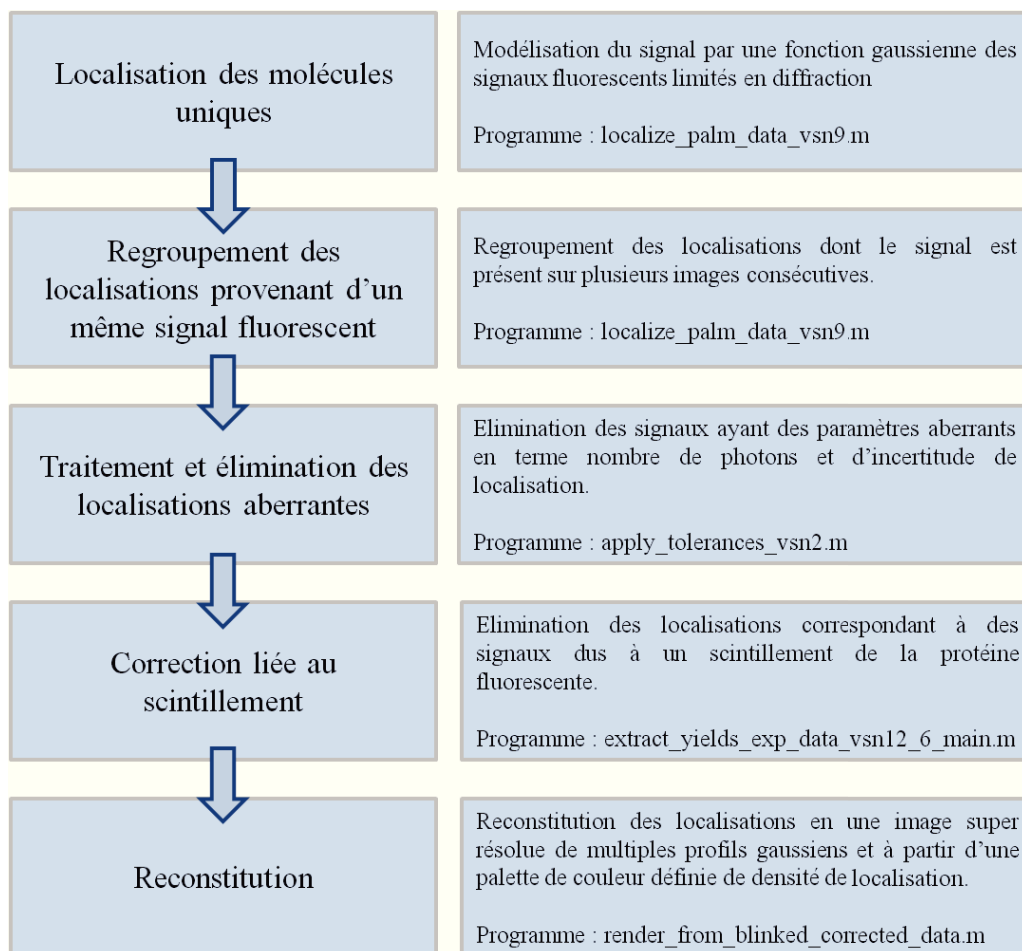
Lors des expériences de microscopie, les souches de *S. pneumoniae* ont été cultivées à 37 °C jusqu'à OD=0,2-0,3 dans un milieu C complété avec 0.5% d'extrait de levure sans antibiotique (Lacks and Hotchkiss, 1960). L'observation sur cellules vivantes a été effectuée à partir d'un transfert des cellules sur une lame de microscopie recouverte d'un gel de gelzan (1.5%, Sigma Aldrich) contenant du milieu C. La fixation des cellules a été effectuée à 20°C pendant 30 min minimum, dans le milieu de culture contenant 2% de paraformaldéhyde. Alternativement, les cellules ont été fixées à 37°C avec 1% de paraformaldéhyde, sans changement de structures observables en PALM. Les cellules ont été lavées trois fois dans du PBS commercial avant transfert entre lame et lamelle de microscopie (Star-Frost;Light Labs.), scellées ou non par du VALAP (mélange équivalent de vaseline, lanolin et paraffin).

## **Conditions d'acquisition**

Après dépôt sur lame, les cellules ont été directement observées sur un microscope Olympus IX81 équipé d'un objectif à immersion à huile (100X, NA = 1.49, Olympus), d'une platine nosepiece IX2-NPS et de différents lasers à l'état solide pompé par des diodes. L'intensité des lasers est contrôlée par un filtre acousto-optique (AOTF). Les signaux fluorescents ont été enregistrés à l'aide d'une caméra CCD contrôlée par le logiciel MetaMorph. La photoconversion et l'excitation de spDendra2 ont été respectivement effectuées par un laser de longueur d'onde 405 nm et un laser de longueur d'onde 561 nm. Pendant l'acquisition, l'intensité du laser à 405 nm a été augmentée de 1% à 100% (intensité maximale :  $14.4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) pour permettre de contrebalancer la diminution du nombre de molécules non-photoconverties. L'intensité du laser à 561 nm est maintenue constante à  $8.8 \times 10^3 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Pour les cellules fixées, l'acquisition est effectuée par une illumination alternative entre le laser à 405 nm et le laser à 561 nm, avec des durées d'illumination respectives de 21 ms ou 30 ms, respectivement. L'acquisition sur cellules vivantes a été effectuée avec une durée d'illumination de 10 ms pour la photoconversion et 15 ms pour l'excitation.

## Localisation des molécules uniques et reconstruction de l'image PALM

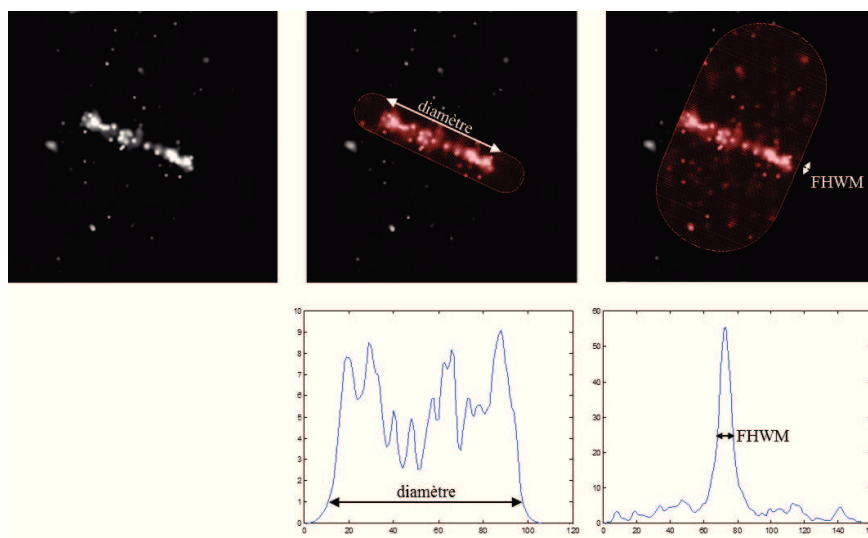
Afin d'augmenter la résolution, la microscopie PALM se base sur la détermination du centre du signal fluorescent pour déterminer la localisation de la molécule. La localisation du centre des signaux est déterminée par une traduction du signal en une structure de type gaussienne, grâce à des programmes informatiques disponibles au laboratoire. Lorsqu'un même signal fluorescent est présent sur plusieurs images consécutives, celui-ci n'est comptabilisé qu'une seule fois. Les données de localisations sont ensuite traitées pour éliminer les localisations dont le signal est aberrant (nombre trop faible de photon, incertitude de position élevée, ...) et pour corriger un surdénombrement dû au scintillement de la protéine, en se basant sur les caractéristiques photophysiques connues de Dendra2. L'image rendue est réalisée par convolution de chaque localisation en un profil gaussien en 2 dimensions avec une largeur à mi-hauteur équivalente à la précision de localisation (Fig. 28).



**Figure 28 :** Diagramme montrant les étapes de traitement de données et de reconstitution d'une image PALM

## Analyse de la géométrie de l'anneau Z et comptage du nombre de molécules

A l'aide du logiciel MicrobeTracker, des zones englobant chacun des anneaux Z ont été sélectionnées manuellement et leur profil d'intensité de fluorescence a été projeté perpendiculairement ou parallèlement au plus grand axe de l'anneau (Fig. 29). A partir de ces projections, les dimensions de l'anneau sont extraites par les programmes Matlab présentés en annexe II et III. Le diamètre de l'anneau Z a été déterminé comme étant la distance entre les deux minimums d'intensité le long du plus grand axe de l'anneau. Pour la mesure de l'épaisseur axiale de l'anneau Z, la projection du signal fluorescent parallèlement au plus grand axe de l'anneau est estimée comme étant proche d'une distribution gaussienne. L'épaisseur axiale de l'anneau Z correspond à la largeur à mi-hauteur (FWHM) de cette fonction gaussienne.



**Figure 29** : mesure des dimensions de l'anneau Z. Haut : image PALM et sélection des zones analysées sous MicrobeTracker (rouge) pour déterminer le diamètre (image du centre) et l'épaisseur de l'anneau (image de droite). Bas : Projection de l'intensité de fluorescence des zones rouges sélectionnées, perpendiculairement (image du centre) ou parallèlement (image de droite) au grand axe de l'anneau. FWHM = largeur à mi-hauteur (Full Half-Width Max)





# Résultats

---

## Présentation de la publication n° I

### Contexte et objectifs de l'étude

La division et l'élongation des bactéries sont assurées par un grand nombre de protéines dont les fonctions enzymatiques, structurales ou régulatrices sont coordonnées au sein de complexes macromoléculaires. La majorité des protéines de la division et de l'élongation sont connues, de nombreuses interactions moléculaires ont été décrites, un certain nombre de tests d'activité enzymatique et des structures cristallographiques sont également disponibles. Toutefois, nous ne comprenons toujours pas bien comment ces protéines s'assemblent dans la cellule pour former des machineries moléculaires fonctionnelles qui assurent la division et l'élongation de la bactérie, tout en préservant sa forme et son intégrité cellulaire. Pour élucider ces mécanismes, il est d'abord nécessaire de comprendre comment s'organisent dans la cellule les protéines qui sont à la base de l'assemblage des machineries de division et d'élongation. Ces protéines "échafauds" sont les protéines du cytosquelette, FtsZ pour la division et MreB pour l'élongation chez les bacilles. FtsZ polymérise en filaments qui forment une structure annulaire au site de division, l'anneau Z. Ce dernier est d'apparence homogène et continue lorsqu'il est visualisé en microscopie à fluorescence conventionnelle. L'anneau Z recrute un grand nombre de protéines de la division et de la synthèse du PG et il aurait également un rôle dans la constriction de la membrane. Chez *S. pneumoniae*, le rôle de FtsZ est d'autant plus important qu'elle est la seule protéine du cytosquelette. En effet chez les ovocoques, l'anneau Z échafaude à la fois les protéines nécessaires à la division et à l'élongation de la bactérie car MreB est absente. La résolution de la microscopie à fluorescence conventionnelle n'est pas suffisante pour visualiser l'architecture des grands assemblages protéiques dans la cellule bactérienne car 250 nm représentent environ un quart de la taille d'un pneumocoque. L'objectif de ce travail a donc été de repousser cette limite de résolution en développant l'usage de la microscopie super-résolue PALM (PhotoActivated Localization Microscopie) chez le pneumocoque, afin d'étudier l'architecture de l'anneau Z *in vivo* à l'échelle du nanomètre. Au départ de ce travail, cette technique avait déjà été utilisée chez des bacilles modèles tels que *E. coli* et *B. subtilis*, mais jamais chez des coques ni des

ovocoques. Dans cette publication, nous décrivons notre stratégie d'adaptation du PALM au pneumocoque, ainsi que les découvertes qui en ont découlées, concernant le remodelage de l'architecture de l'anneau Z au cours du cycle cellulaire de *S. pneumoniae*.

## Résultats

### **spDendra2, une protéine photoconvertible optimisée pour des études PALM dans des cellules de pneumocoque**

La première étape de ce projet consistait à obtenir une protéine fluorescente fonctionnelle pour l'étude en microscopie PALM chez le pneumocoque. Nous avons dans un premier temps fusionné le gène *ftsZ* au gène *dendra2* et introduit le gène de fusion dans le génome du pneumocoque, au niveau d'un site ectopique. Aucun signal fluorescent n'a été détecté en microscopie à fluorescence conventionnelle, pré-requis pour envisager des études PALM. Une analyse, par immunodétection de FtsZ, des cellules exprimant Dendra2-FtsZ a révélé que la protéine de fusion était présente à un niveau très faible dans les cellules. Ce problème pouvait être lié à un faible niveau d'expression du gène de fusion *dendra2-ftsZ*, dû à une occurrence de codons chez *dendra2* peu présents chez le pneumocoque, ou à une instabilité de la protéine de fusion. Pour pallier au premier problème, nous avons commandé un gène *dendra2* synthétique dont la séquence nucléique était optimisée pour une expression chez *S. pneumoniae*. Par ailleurs, pour stabiliser la protéine de fusion, les extrémités N-terminales et C-terminales de spDendra2 ont été remplacées par celles de la GFP car cette stratégie avait déjà été décrite comme permettant de stabiliser d'autres protéines de fusion fluorescentes. Le gène résultant fut nommé *spdendra2*. L'ingénierie de la protéine fluorescente nous a permis d'obtenir un signal fluorescent de qualité suffisante pour entreprendre les études PALM. Lorsque le gène *spdendra2* a été fusionné à la copie endogène de *ftsZ*, le profil de localisation en microscopie à fluorescence conventionnelle était identique à celui précédemment décrit pour FtsZ-GFP, et les cellules ne présentaient aucun défaut de division et de croissance. L'ensemble de ces observations indiquaient que nous disposions d'une protéine fusion FtsZ-spDendra2 fonctionnelle pour nos études de PALM.

### **Caractérisation de l'anneau Z du pneumocoque**

L'observation de de l'anneau Z en PALM a révélé des caractéristiques inattendues concernant les dimensions de l'anneau, la disposition des molécules au sein de l'anneau et la présence d'une nouvelle sous-structure non décrite dans la littérature.

En PALM, l'anneau Z a montré une structure hétérogène, constituée de régions de forte densité alternant avec des zones de faible densité. Le pneumocoque se déposant sur les lames de microscopie le long de son axe principal, la majorité des anneaux a été observée sur la tranche et leur image était le résultat d'une projection de l'anneau le long de son axe radial. Toutefois, l'orientation de certaines cellules nous a permis d'observer des anneaux Z inclinés, qui ont pu être analysés pour déterminer la distribution réelle de FtsZ dans l'anneau. Le programme DBSCAN nous a permis de mettre en évidence la présence d'amas ("clusters") de FtsZ, de taille et de distribution hétérogène au sein de l'anneau. Pour vérifier que cette structure granulaire n'était pas due à un sous échantillonnage des molécules imagées ou à un artéfact de reconstruction, nous avons simulé *in silico* l'acquisition de données PALM et la reconstruction de l'image finale à partir d'un anneau dans lequel les molécules de FtsZ étaient distribuées de façon homogène. Ces analyses ont permis de conclure que les amas ("clusters") de FtsZ ont vraisemblablement une pertinence physiologique.

### **Remodelage de la nanostructure de l'anneau Z au cours du cycle cellulaire**

Afin de reconstituer l'architecture de l'anneau Z au cours du cycle cellulaire, nous avons classé les cellules en fonction de deux paramètres: la localisation et le diamètre de l'anneau Z. Nous avons ainsi classé les cellules en 4 catégories principales: stades de division I, II, III et doubles anneaux. Dans le stade I, les anneaux Z ne présentent pas de constriction apparente (diamètre de 1200-800 nm) et leur épaisseur axiale est d'environ 95 nm. Lors de la constriction (stade II, diamètre de 800-450 nm), l'anneau Z semble plus dense et plus homogène, son épaisseur axiale est d'environ 127 nm en fin de constriction. De façon étonnante, alors que l'anneau Z s'épaissit de 32 nm entre la phase pré-divisionnelle et la fin de la constriction, le nombre de molécules au sein de l'anneau ne varie pas. Ceci indique que l'épaississement de l'anneau Z au cours de la constriction est dû à un réarrangement géométrique. Au stade III (diamètre < 450 nm), le nombre de molécules de FtsZ au sein de l'anneau parental diminue et deux nouveaux anneaux Z apparaissent aux sites de division des futures cellules filles.

Enfin, nous avons observé dans 4% des cellules, la présence d'une nouvelle sous-structure : un double anneau localisé de part et d'autre du milieu de la cellule. En contraste de phase, les cellules possédant ce double anneau Z sont légèrement allongées. Le diamètre moyen des doubles anneaux est intermédiaire entre le stade I et le stade II (~850 nm), et la distance qui les sépare est variable, allant de 50 à 300 nm. Le nombre total de molécules de



FtsZ dans les deux anneaux est égal au nombre de molécules présentes dans l'anneau unique pré-divisionnel (stade I) et ces doubles anneaux ne sont jamais observés au stade III.

## Conclusion

L'ensemble de ces observations nous a permis de proposer un modèle dans lequel au début du cycle cellulaire, les filaments de FtsZ forment des amas qui s'assemblent au site de division en une structure annulaire granuleuse d'une épaisseur d'environ 95 nm. Nous ne pouvons exclure l'hypothèse que la nouvelle sous-structure observée, le double anneau Z, soit une localisation aberrante de FtsZ, non fonctionnelle pour la division. Toutefois, le fait que ce soit la seule sous-structure originale observée, que ses dimensions et le nombre de molécules de FtsZ qu'elle contient ne soient pas aberrantes, suggèrent que les doubles anneaux Z pourraient être une structure physiologique, résultant de la partition de l'anneau pré-divisionnel. Le fait que ces doubles anneaux soient séparés par des distances variables suggère qu'ils pourraient s'éloigner progressivement, probablement suite à la synthèse de PG dans la région qu'ils définissent. La distance maximale qui sépare les doubles anneaux Z est de l'ordre de grandeur de la distance séparant les deux anneaux de MapZ au début du cycle cellulaire (voir p. 36-37). MapZ pourrait donc être impliquée dans la séparation des doubles anneaux Z. Bien que leur pertinence physiologique reste à vérifier, les doubles anneaux Z pourraient être liés à la localisation de la machinerie d'élongation du PG.

Lorsque la constriction débute, les doubles anneaux Z ne sont plus visibles, on observe alors un anneau unique d'épaisseur supérieure à celle de l'anneau pré-divisionnel. Dans un modèle qui intègre la présence de doubles anneaux Z, nous proposons qu'au stade II de division, les deux anneaux Z reviennent vers le site de division, possiblement dirigés par MapZ qui elle aussi se re-localise dans cette région après avoir formé un double anneau. Si les deux anneaux Z sont séparés d'une distance inférieure à 40 nm, ils ne pourront pas être résolus car la résolution spatiale de nos images est de 38 nm. Dans ce cas, la présence d'un double anneau Z non résolu pourrait expliquer pourquoi au stade II, l'anneau Z est imagé sous la forme d'un anneau unique d'épaisseur supérieure à celle de l'anneau pré-divisionnel.

**Publication n° I :**  
**Remodeling of the Z-ring nanostructure during the Streptococcus pneumoniae cell cycle revealed by photoactivated localization microscopy**



# Remodeling of the Z-Ring Nanostructure during the *Streptococcus pneumoniae* Cell Cycle Revealed by Photoactivated Localization Microscopy

Maxime Jacq, Virgile Adam, Dominique Bourgeois, Christine Moriscot, Anne-Marie Di Guilmi, Thierry Vernet, Cécile Morlot

University of Grenoble Alpes, IBS, Grenoble, France; CNRS, IBS, Grenoble, France; CEA, IBS, Grenoble, France

**ABSTRACT** Ovococci form a morphological group that includes several human pathogens (enterococci and streptococci). Their shape results from two modes of cell wall insertion, one allowing division and one allowing elongation. Both cell wall synthesis modes rely on a single cytoskeletal protein, FtsZ. Despite the central role of FtsZ in ovococci, a detailed view of the *in vivo* nanostructure of ovococcal Z-rings has been lacking thus far, limiting our understanding of their assembly and architecture. We have developed the use of photoactivated localization microscopy (PALM) in the ovococcus human pathogen *Streptococcus pneumoniae* by engineering spDendra2, a photoconvertible fluorescent protein optimized for this bacterium. Labeling of endogenously expressed FtsZ with spDendra2 revealed the remodeling of the Z-ring's morphology during the division cycle at the nanoscale level. We show that changes in the ring's axial thickness and in the clustering propensity of FtsZ correlate with the advancement of the cell cycle. In addition, we observe double-ring substructures suggestive of short-lived intermediates that may form upon initiation of septal cell wall synthesis. These data are integrated into a model describing the architecture and the remodeling of the Z-ring during the cell cycle of ovococci.

**IMPORTANCE** The Gram-positive human pathogen *S. pneumoniae* is responsible for 1.6 million deaths per year worldwide and is increasingly resistant to various antibiotics. FtsZ is a cytoskeletal protein polymerizing at midcell into a ring-like structure called the Z-ring. FtsZ is a promising new antimicrobial target, as its inhibition leads to cell death. A precise view of the Z-ring architecture *in vivo* is essential to understand the mode of action of inhibitory drugs (see T. den Blaauwen, J. M. Andreu, and O. Monasterio, *Bioorg Chem* 55:27–38, 2014, doi:10.1016/j.bioorg.2014.03.007, for a review on FtsZ inhibitors). This is notably true in ovococoid bacteria like *S. pneumoniae*, in which FtsZ is the only known cytoskeletal protein. We have used superresolution microscopy to obtain molecular details of the pneumococcus Z-ring that have so far been inaccessible with conventional microscopy. This study provides a nanoscale description of the Z-ring architecture and remodeling during the division of ovococci.

Received 3 July 2015 Accepted 22 July 2015 Published 18 August 2015

**Citation** Jacq M, Adam V, Bourgeois D, Moriscot C, Di Guilmi A-M, Vernet T, Morlot C. 2015. Remodeling of the Z-ring nanostructure during the *Streptococcus pneumoniae* cell cycle revealed by photoactivated localization microscopy. *mBio* 6(4):e01108-15. doi:10.1128/mBio.01108-15.

**Editor** Caroline S. Harwood, University of Washington

**Copyright** © 2015 Jacq et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/), which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Address correspondence to Cécile Morlot, [cecile.morlot@ibs.fr](mailto:cecile.morlot@ibs.fr), or Virgile Adam, [virgile.adam@ibs.fr](mailto:virgile.adam@ibs.fr).

The tubulin homologue FtsZ is the major bacterial cytoskeleton protein. *In vivo*, it forms 4- to 5-nm-thick and 40- to 120-nm-long filaments (1, 2) that assemble into an annular structure called the Z-ring, which is positioned at midcell underneath the cytoplasmic membrane and is required for cytokinesis. Filament turnover relies on polymerization/depolymerization cycles, during which GTP binding triggers head-to-tail association of FtsZ subunits and GTP hydrolysis causes dissociation of the polymers (3). These filaments act as scaffolding elements for the recruitment of various division proteins, including proteins in charge of FtsZ association with the cytoplasmic membrane, FtsZ filament organization, cell wall growth and remodeling, chromosome dimer resolution, membrane fission, and cell separation (3–5).

Beyond having a scaffolding function, FtsZ is most likely involved in the generation of the constrictive force required for cytokinesis (3). One model proposes that the Z-ring undergoes constriction through a sliding motion between FtsZ filaments (6, 7). Another model proposes that continued constriction arises from

the combination between FtsZ polymerization/depolymerization cycles and membrane bending induced by the curvature of nucleotide-bound FtsZ filaments (8–11). This model does not exclude the contribution of cell wall synthetic and remodeling enzymes to cytokinesis. Indeed, it is likely that the septal ingrowth of the cell wall pushes against the cytoplasmic membrane, contributing to the force required for invagination and to the stabilization of small local membrane constrictions (2, 12). Conversely, the constriction of FtsZ filaments will likely influence the kinetics of cell wall remodeling.

An important aspect of these models remains largely uncertain, namely, the structure adopted *in vivo* by FtsZ filaments at the nanoscale level. For many years since its initial observation by conventional fluorescence microscopy (13), the FtsZ macromolecular assembly has been modeled as a closed ring. Two electron cryotomography studies performed on *Caulobacter crescentus* and *Escherichia coli* cells provided controversial data, one showing loosely scattered bands of FtsZ protofilaments that support a

model in which the Z-ring is discontinuous (2) and the other showing filament doublets that support the closed-ring hypothesis (7). In parallel, photoactivated localization microscopy (PALM) experiments performed with *E. coli* and *C. crescentus* suggested that the Z-ring displays regions of varied densities and that the high-density regions are made of heterogeneous clusters of stationary, and therefore most likely polymerized, FtsZ molecules (14–16). In addition, these studies suggested that the FtsZ filaments most likely adopt a loose and overlapping three-dimensional (3D) arrangement in the high-density regions. Finally, 3D structured illumination microscopy (SIM) showed that the Z-rings in *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pneumoniae* display a bead-collar-like structure, with the beads representing regions of high densities of FtsZ molecules (17, 18). All these studies suggest that the Z-ring might not form a packed and continuous ring but might rather be made of a heterogeneous arrangement of loose protofilament clusters. However, many questions remain open, in particular regarding the rearrangement of the filament clusters and the remodeling of the Z-ring throughout the division cycle. Recently, a high-throughput PALM study has allowed imaging of the nanostructure of the Z-ring at different stages of the *C. crescentus* cell cycle (19). Very few continuous rings were observed at all stages of the cell cycle, thus supporting a model in which the Z-ring is made of sparsely distributed patches of FtsZ filaments throughout the cell division process. In addition, the axial and radial thicknesses of the Z-ring were found to be approximately constant during constriction, with mean values of 71 nm and 64 nm, respectively.

These first superresolution studies provided important insights into the *in vivo* organization of the Z-ring, but the understanding of the general mechanisms of assembly and constriction now requires a nanoscale description of the Z-ring in other bacterial morphogenetic models.

Ovococci form a morphological group that includes several human pathogens (enterococci and streptococci). Their shape results from two modes of cell wall insertion, one allowing division by synthesizing a cross wall perpendicular to the main axis of the cell (septal synthesis) and another one allowing limited elongation by synthesizing the cell wall in restricted regions flanking the division site (peripheral synthesis). Since MreB is absent in ovococcal bacteria, both the division and the elongation machineries rely on the Z-ring to position the sites of cell wall synthesis at midcell (20, 21). Despite the central role of the Z-ring in ovococci, little is known regarding its architecture. The pneumococcal Z-ring appears as a bead-like single ring by 3D SIM (17, 22, 23), but we still lack structural details at the nanoscale level to understand how it controls the scaffolding of the growth and division machineries throughout the cell cycle.

Here, we report the investigation by PALM of the nanostructure of FtsZ in the ovococcal human pathogen *S. pneumoniae*. After modification of the photoconvertible fluorescent protein (PCFP) Dendra2, we imaged the Z-ring nanostructure at different stages of the bacterial cell cycle, using a strain expressing a single copy of FtsZ labeled at the native locus. In support of previous observations of bacteria with different shapes (2, 16, 18, 19), our images show that the Z-ring in ovococci is made of heterogeneous clusters of protofilaments at the division site. Our data also reveal a previously uncharacterized dynamic axial rearrangement of the Z-ring during constriction and the presence of double septal Z-rings in a fraction of the cell population. These observations are

integrated into a model describing the nanostructural progression of the Z-ring throughout the pneumococcal cell cycle.

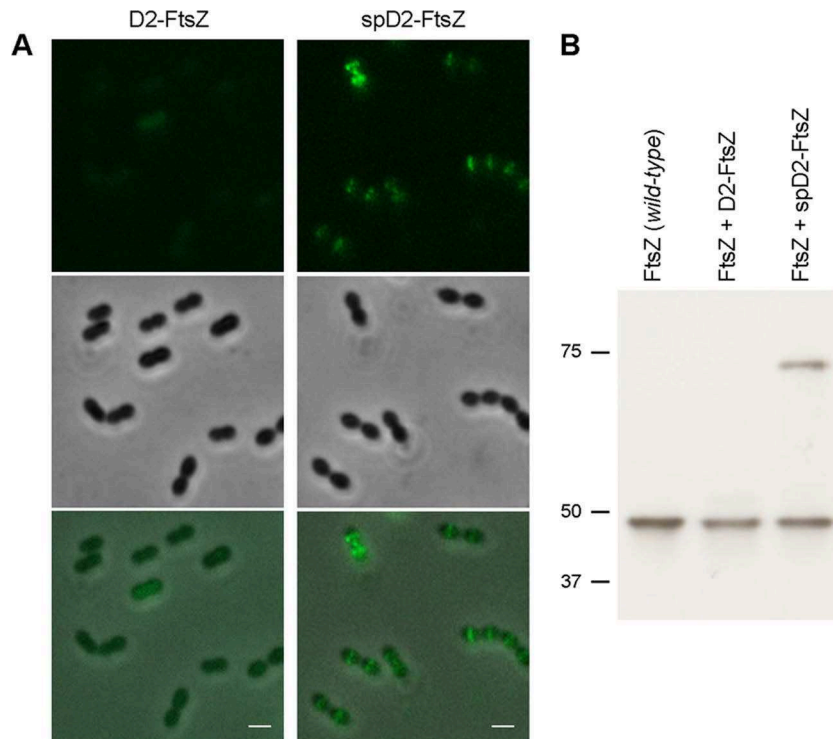
## RESULTS

**Engineering of a functional FtsZ-Dendra2 fusion for *S. pneumoniae*.** To preserve interactions between FtsZ's C-terminal region and its partners (4, 24, 25), we first tested the expression of an FtsZ N-terminal fusion to the PCFP Dendra2. Dendra2 emits green fluorescence before photoconversion, a property that allowed checking its expression by epifluorescence before starting the PALM experiments. In addition, Dendra2 is monomeric, which induces minimal perturbations to the labeled target, and displays low blinking levels (26, 27), which facilitates accurate counting of single molecules.

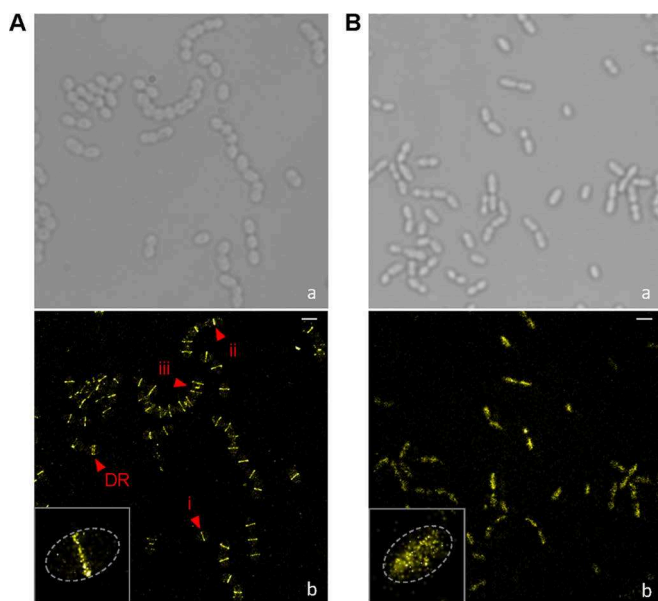
In order to minimally impact the Z-ring assembly and decorate the ring with only a few fluorescent markers, Dendra2-FtsZ was first expressed under the control of a zinc-inducible promoter at the ectopic site of *bgaA* in *S. pneumoniae*. As illustrated in Fig. 1A, no signal could be detected using epifluorescence. Analysis of the expression level of Dendra2-FtsZ showed that it was expressed at levels too low to be measured by immunodetection (Fig. 1B). To solve this problem, we designed a synthetic Dendra2 gene harboring codons optimized for expression in *S. pneumoniae* (the spDendra2 gene) (see Fig. S1A in the supplemental material). In addition, we replaced the N and C termini of Dendra2 with the N and C termini of the green fluorescent protein (GFP) (Fig. S1B), a strategy known to confer better stability to red fluorescent proteins of anthozoan origin (28). Efficient expression of the fusion protein between FtsZ and spDendra2 (spDendra2-FtsZ) was revealed by Western blotting (Fig. 1B) and confirmed by the observation of a bright fluorescence signal localized at the *S. pneumoniae* division site (Fig. 1A). The similarity between the localization patterns of spDendra2-FtsZ and GFP<sup>+</sup>-FtsZ (29) and FtsZ immunolocalization patterns (30) suggests that the N-terminal spDendra2 label does not impair the localization pattern of FtsZ. However, attempts to delete the native *ftsZ* gene in this strain failed, most probably because the expression level of ectopic spDendra2-FtsZ is too low to complement an *ftsZ* deletion (Fig. 1B).

We then considered designing an N-terminal spDendra2-FtsZ fusion at the native *ftsZ* locus under the control of the native promoter. The reporting of a functional endogenous C-terminal FtsZ-GFP<sup>+</sup> fusion by Fleurie and company (31) prompted us to instead construct a strain expressing a C-terminal FtsZ-spDendra2 fusion. This endogenous FtsZ-spDendra2 fusion displays a septal fluorescence signal that is very homogeneous among the pneumococcal population (Fig. 2A), and immunodetection was used to show that the levels of FtsZ-spDendra2 expressed were similar to endogenous levels in wild-type cells (Fig. S1C). In addition, the wild-type growth rate and cell length distributions (Fig. S1D and E) displayed by this strain indicate that the endogenous FtsZ-spDendra2 fusion assembles as a contractile ring, does not impair the cell division process, and is therefore functional.

**spDendra2 is a functional PCFP for PALM studies of *S. pneumoniae*.** PALM images were collected under wide-field illumination of fixed and live pneumococcal cells expressing FtsZ-spDendra2 (see Fig. S2 in the supplemental materials and see details in Materials and Methods below). We obtained an average localization precision of  $22 \pm 3$  nm, and the spatial resolution of



**FIG 1** Development of spDendra2 for PALM studies of *S. pneumoniae*. Live cells expressing the ectopic Dendra2-FtsZ (D2-FtsZ) or spDendra2-FtsZ (spD2-FtsZ) fusions were visualized at an  $OD_{600}$  of 0.3 using conventional microscopy. Dendra2 and spDendra2 green epifluorescence, phase-contrast, and merged images are shown. Scale bars = 1  $\mu\text{m}$ . (B) Expression levels of native FtsZ (FtsZ) and of ectopic Dendra2-FtsZ (D2-FtsZ) and spDendra2-FtsZ (spD2-FtsZ) fusions in strains R6 (left lane), spCM18 (middle lane), and spCM72 (right lane). Samples of cultures were harvested at an  $OD_{600}$  of 0.3 for the preparation of protein extracts. Equivalent amounts of total proteins for each sample were separated by SDS-PAGE, blotted to membranes, and analyzed by immunoblotting using anti-FtsZ serum. Positions of molecular mass markers are indicated by the numbers (in kilodaltons) to the left of the blots.

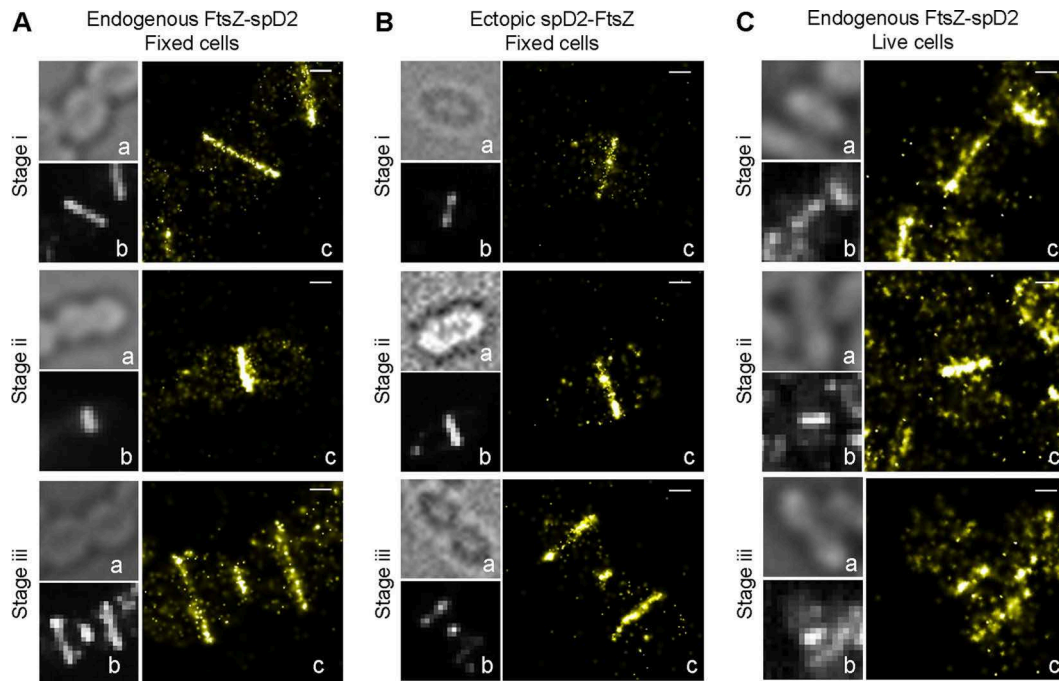


**FIG 2** FtsZ displays specific septal patterns in fixed *S. pneumoniae* cells. Pneumococcal cells expressing an endogenous FtsZ-spDendra2 fusion (spMJ40) (A) or free spDendra2 in their cytoplasm (spMJ33) (B) were fixed and imaged at an  $OD_{600}$  of 0.3. Bright fields (a) and reconstructed PALM images (b) are shown. Red arrowheads point at cells in one of the three stages described in Fig. 3 or at a cell displaying a double ring (DR) of FtsZ as illustrated in Fig. 6. Gray-boxed inset images are 5-fold magnifications of one predivisional PALM pattern displayed in panel b. Dashed gray lines represent the periphery of the cell. Scale bars = 2  $\mu\text{m}$ .

the reconstructed PALM images was estimated to be  $\sim 38$  nm (Nyquist-limited resolution).

In order to determine the counting efficiency of spDendra2 fused to FtsZ, we measured the total amount of FtsZ molecules using immunodetection and compared it to the average number of FtsZ-spDendra2 molecules imaged by PALM. Using immunodetection (Fig. S2E), FtsZ was found to be present at  $3,500 \pm 800$  molecules per cell, which is in the same range as the  $\sim 3,000$  molecules previously reported for *S. pneumoniae* Rx1 (32). Quantitative analysis of the PALM images provided an average number of  $670 \pm 240$  imaged molecules per cell ( $n = 217$ ). The ratio of imaged FtsZ-spDendra2 molecules with respect to the estimated cellular copy number is therefore  $\sim 20\%$ , which can be accounted for by limited photoconversion efficiency, residual protein misfolding, or improper chromophore maturation in the anaerobic *S. pneumoniae* bacterium (33, 34). Overall, these results demonstrate that spDendra2 is a PCFP well suited for PALM studies of *S. pneumoniae*.

**Pneumococcal FtsZ displays specific patterns throughout the cell cycle.** The Z-ring is a highly dynamic structure undergoing constant renewal due to the rapid exchange between polymerized FtsZ molecules assembled in the ring and monomeric FtsZ molecules (14, 35–37). In order to trap and visualize Z-ring nanostructures at all stages of cell division, including hypothetical structures of a short-lived nature, we fixed ensembles of pneumococcal cells growing asynchronously and collected PALM images. The homogeneous labeling provided by the endogenous FtsZ-spDendra2



**FIG 3** PALM images of representative patterns of the Z-ring throughout the pneumococcal cell cycle. Typical pneumococcal cells expressing the endogenous FtsZ-spDendra2 fusion (spMJ40) (A and C) or the ectopic spDendra2-FtsZ fusion (spCM72) (B) were classified into three stages defined by the diameter of the Z-ring, the cell length, and the distributions of FtsZ at the division site of the mother cell and the division sites of the two daughter cells. Cells were either fixed (A and B) or directly imaged (C) at an  $OD_{600}$  of 0.3. Bright-field (a), diffraction-limited (b), and reconstructed PALM (c) images are shown. Scale bars = 250 nm.

fusion over the whole pneumococcal population (Fig. 2A) indicated that our fixation conditions preserved Z-ring assembly at midcell and allowed us to extract meaningful data at all stages of the cell cycle. Importantly, cells expressing free spDendra2 (Fig. 2B) did not show enriched fluorescence signals at midcell, confirming that the structured patterns observed in cells expressing the fused version specifically result from the assembly of FtsZ into Z-rings.

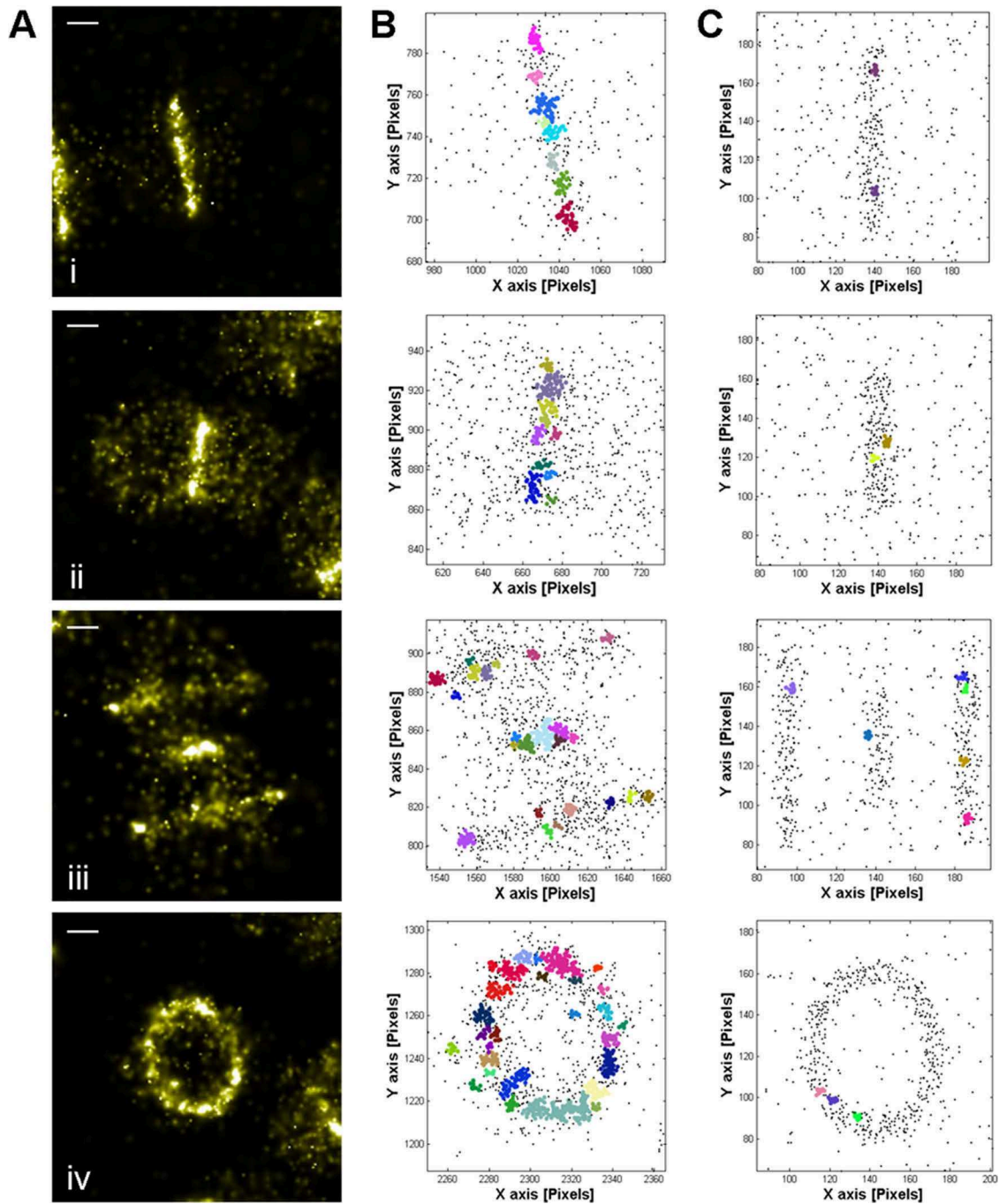
Based on the measurement of the Z-ring diameter and FtsZ-spDendra2 localization, we classified the pneumococcal cells into three classes representative of the main FtsZ PALM patterns observed throughout the cell cycle (Fig. 3A and S3). The first class (stage i), which represents 57% of the entire cell population ( $n = 217$ ), corresponds to cells that do not show apparent constriction in bright-field images and cells in which the Z-ring displays a diameter ranging from 1,200 to 700 nm. In this category of cells, the ring displays a heterogeneous FtsZ distribution. The second class (stage ii, 24% of the cell population) contains cells showing a clear constriction in bright-field images and cells in which the Z-ring displays a diameter ranging between 800 and 450 nm. At this stage, the Z-ring appears brighter, less heterogeneous, and thicker. In the third class (stage iii, 15% of the cell population), FtsZ molecules disassemble from the parental division site and start reassembling at the division sites of the future daughter cells. The diameter of the parental Z-ring in these cells is smaller than 450 nm. At stage iii, the FtsZ clusters become visible again in the parental ring and the two new Z-rings assembling at the future division sites of the daughter cells look similar to those observed at stage i. Finally, 4% of the cells surprisingly display double Z-rings, which will be described in a separate section.

Consistently with the idea that the presence of the spDendra2

label does not impair the structure of the Z-ring, the same PALM nanostructures could be visualized when the native Z-ring was decorated with the ectopic spDendra2-FtsZ fusion (Fig. 3B and S4A). Similar PALM nanostructures were also observed in live pneumococcal cells (Fig. 3C and S4B), indicating that the patterns observed in fixed cells were not significantly modified by paraformaldehyde fixation.

A quantitative analysis of our PALM data show that, at stage i, the total number of imaged FtsZ-spDendra2 molecules per cell ( $n = 125$ ) was  $600 \pm 200$ , while  $300 \pm 60$  molecules were imaged at midcell. At stage ii, the total number of FtsZ-spDendra2 molecules and the number of septal FtsZ-spDendra2 molecules imaged per cell ( $n = 51$ ) were estimated to be  $700 \pm 250$  and  $300 \pm 80$ , respectively. Assuming a homogeneous efficiency of counting of spDendra2 molecules throughout the imaging field of view, we conclude that about 50% and 42% of FtsZ molecules are present in the ring at stages i and ii, respectively. Due to the ovoid shape of the pneumococcus, the majority of the cells lie along their longitudinal axis, with the septal plane perpendicular to the microscope slide. Most of the Z-rings are therefore imaged on their side, and the observed patterns result from the 2D projection of the ring along the radial axis of the pneumococcal cells, obscuring the exact FtsZ distribution. Thus, the number of detected molecules in these rings might be underestimated by the fact that the diameter of the Z-rings at stage i is larger than the depth of field (DOF) of our microscope objective ( $<700$  nm).

**Pneumococcal FtsZ forms a clustered ring-like structure at midcell.** At all stages of the cell cycle, the PALM images reveal an irregular Z-ring structure made of large regions displaying high fluorescence intensity alternating with regions of low fluorescence intensity (Fig. 3 and 4A, and see Fig. S3 and S5 in the supplemental

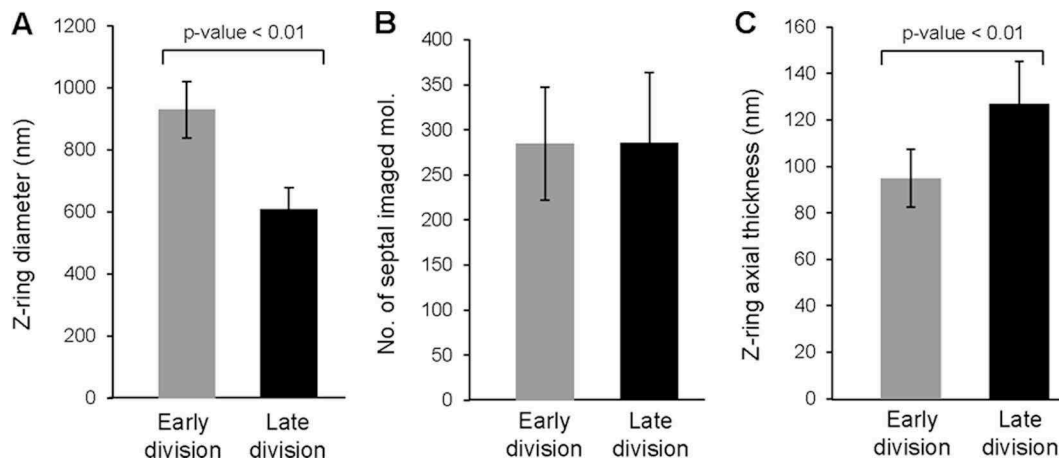


**FIG 4** The pneumococcal Z-ring is made of heterogeneous clusters. (A) Reconstructed PALM image of the Z-ring in fixed cells expressing the endogenous FtsZ-spDendra2 fusion at stages i, ii, and iii or in a tilted orientation (iv). Scale bars = 250 nm. (B) Cluster analysis of the PALM images shown in panel A using the DBSCAN algorithm (38). Different colors are used to visualize the different clusters. Nonclustered molecules are shown as black dots. (C) Cluster analysis of simulated PALM imaging of continuous and homogeneous Z-rings. The cluster diameter threshold was set at 22 nm.

material). Cluster analysis of stages i to iii using DBSCAN (38) shows the presence of FtsZ clusters within the ring at all stages of constriction (Fig. 4B). To get a more accurate view of these FtsZ clusters, we took advantage of the tilted orientation of some chained cells, in which we could observe tilted Z-rings (Fig. 4A, panel iv, and Fig. S5). The diameter of the Z-ring in all these cells is larger than 800 nm, indicating that they belong to predivisinal

stage i. These tilted cells allow observation of Z-rings in a pseudo-3D manner at a resolution that exceeds that typically featured by 3D PALM using, e.g., the astigmatism method (39). In addition, the Z-ring shown in Fig. 4A (panel iv) is tilted by around 90° and is therefore completely encompassed within the depth of field of our microscope objective. Cluster analysis of this tilted Z-ring using DBSCAN indicates that it contains 28 FtsZ clusters





**FIG 5** The Z-ring's axial thickness increases during constriction. (A) Mean values for the Z-ring diameter (A), the number of imaged septal FtsZ molecules (B), and the Z-ring's axial thickness (C) are reported for fixed cells in the early (Z-ring diameter > 800 nm [dark gray]) or late (Z-ring diameter < 700 nm [black]) divisional stage. During constriction, the Z-ring's axial thickness increases by ~32 nm while the number of imaged FtsZ-spDendra2 molecules at the division site shows no significant variation. Error bars represent standard deviation values.

(Fig. 4B), in which between 7 and 135 FtsZ-spDendra2 molecules are imaged. On the other hand, the low-intensity regions and the cytoplasm contain discrete molecules. DBSCAN analysis of the Z-rings that are tilted by less than  $90^\circ$  (Fig. S5) indicates that they contain similar densities of clusters, except in regions located outside the depth of field of the objective.

In order to exclude the hypothesis that the observed granular arrangement of the Z-ring results from a reconstruction artifact, we simulated PALM images of spDendra2 molecules homogeneously distributed within areas representing 2D projections of Z-rings typical of cells at stages i, ii, and iii or viewed in a tilted orientation. A copy number of spDendra2 molecules equivalent to the experimental mean number of imaged molecules in the rings was used, and the simulation took into account multiple factors that influence the final PALM images, including the fluorescence background level and the photophysical behavior of spDendra2 that we extracted from the real data (26). Cluster analysis of the simulated PALM images using DBSCAN parameters equivalent to the ones that we used to analyze the experimental data show the quasi-absence of clusters in the simulated reconstructed rings (Fig. 4C). Thus, we conclude that the experimental FtsZ clusters imaged in the pneumococcal Z-rings are most likely real.

**The pneumococcal Z-ring thickens during constriction.** Interestingly, during late division, when the Z-ring shows a clear constriction, the Z-ring appears thicker, brighter, and more homogeneous than during early division (Fig. 3, 4, and S3). We can, however, still visualize FtsZ clusters at this stage (Fig. 4B).

We measured the axial thickness of the Z-ring in cells at early (Z-ring diameter larger than 800 nm) and late (Z-ring diameter smaller than 700 nm) division stages (Fig. 5A). We obtained mean axial thickness values of  $95 \pm 12$  nm ( $n = 65$ ) and  $127 \pm 18$  nm ( $n = 64$ ) for early and late divisional Z-rings, respectively (Fig. 5C), revealing a 32-nm thickening of the ring upon constriction. The number of imaged septal FtsZ-spDendra2 molecules in early and late divisional cells ( $300 \pm 60$  and  $300 \pm 80$ , respectively) (Fig. 5B) indicates that neither the higher brightness nor the increased axial thickness of the Z-ring at stage ii is due to the recruitment of additional FtsZ-spDendra2 molecules.

Based on Z-ring dimensions (Fig. 5A and C), we calculated the

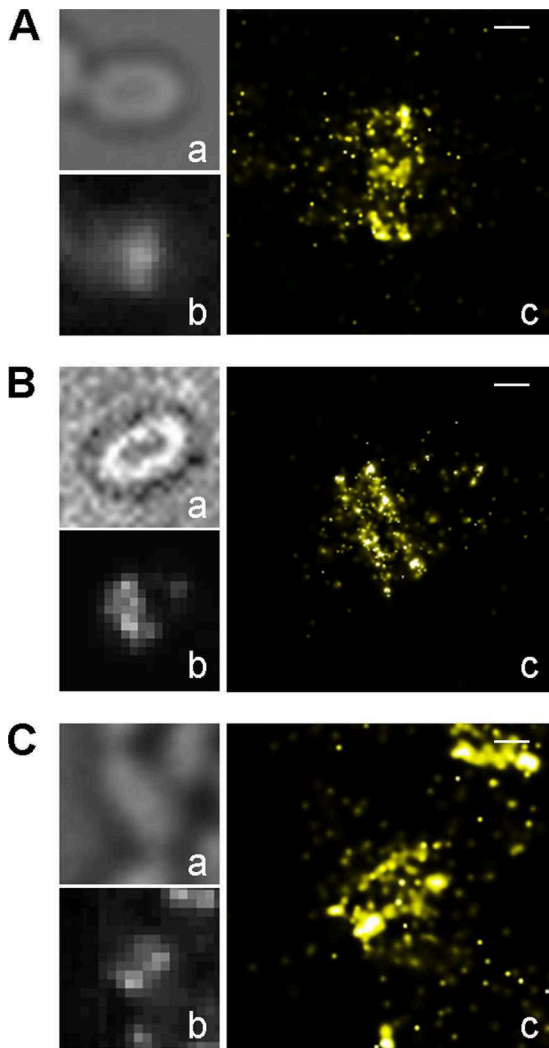
area of the 2D projection of the Z-ring along the radial axis and obtained mean area values of  $\sim 90 \times 10^3$  nm<sup>2</sup> and  $\sim 80 \times 10^3$  nm<sup>2</sup> for early and late division rings, respectively. This observation indicates that despite the 32-nm increase of the Z-ring thickness, the area of the 2D projection of the ring decreases during constriction, which is why the Z-ring appears brighter at stage ii.

**FtsZ displays double-ring patterns.** Unexpectedly, 4% of cells in the reconstructed PALM images display double Z-rings at midcell (Fig. 6 and S6A), separated by variable distances, ranging from ~50 to ~300 nm, with an average distance of  $164 \pm 72$  nm ( $n = 16$ ). The absence of curvature of the double rings and the lack of signal connecting them indicate that they do not correspond to the two halves of tilted Z-rings. In order to determine whether double rings result from artifactual step motions of the cells during data collection, we split the PALM data set into two consecutive subsets and reconstructed the corresponding PALM images. The double Z-rings could be visualized in the two data subsets, indicating that they correspond to a real localization pattern of FtsZ. Double Z-rings could be observed in fixed and live cells expressing the endogenous FtsZ-spDendra2 fusion or the ectopic spDendra2-FtsZ fusion (Fig. 6A to C), suggesting that they are due neither to a fixation artifact nor to a loss of function caused by C- or N-terminal fusions of spDendra2 to FtsZ. Overall, the double Z-rings may result from a biologically significant assembly of two spatially separated Z-rings at midcell.

We never observed any double Z-ring at the peripheral sites of stage iii cells. In addition, the observed cells do not show any visible constriction and the double Z-rings display diameters of  $850 \pm 100$  nm (Fig. S6B). A total number of  $300 \pm 90$  FtsZ-spDendra2 molecules were imaged in the double Z-rings (Fig. S6C), indicating that, overall, they contain the same amount of FtsZ molecules as single predivisional rings. These observations suggest that the double-Z-ring structures may correspond to short-lived intermediates between stages i and ii, possibly due to splitting of the initial Z-ring.

## DISCUSSION

We have employed PALM to study the nanostructure of FtsZ in a pathogenic ovococoid bacterium, *S. pneumoniae*. To that pur-



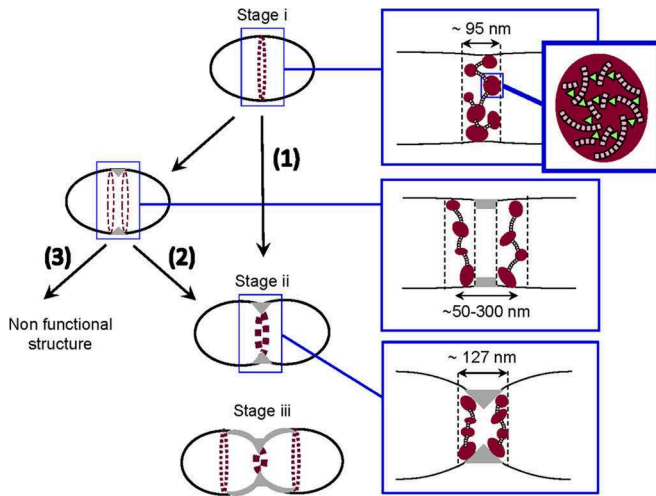
**FIG 6** Pneumococcal FtsZ displays double-ring patterns. Pneumococcal cells expressing the endogenous FtsZ-spDendra2 fusion (spMJ40) (A and C) or the ectopic spDendra2-FtsZ fusion (spCM72) (B) were either fixed (A and B) or directly imaged (C) at an  $OD_{600}$  of 0.3. Bright-field (a), diffraction-limited (b), and reconstructed PALM (c) images are shown. Scale bars = 250 nm.

pose, we have designed spDendra2, a PCFP whose gene was codon optimized for this bacterium, and we have used a bacterial strain expressing a single copy of the endogenous *ftsZ* gene. Besides supporting a patchy band model for the assembly of FtsZ molecules at the division site, our data provide details into the remodeling of the Z-ring during the cell cycle of ovococci.

**FtsZ forms heterogeneous clusters at midcell in bacteria with different shapes.** Two main models have been proposed for the spatial organization of the Z-ring (12). The first one proposes that FtsZ molecules form a continuous ring at midcell. This model is supported by the capacity of FtsZ filaments to bundle *in vitro* and by the observation of continuous Z-rings reconstituted in artificial lipid tubules (7, 25, 40). The second model, called the “patchy band” or “bead-like” model, proposes that short FtsZ protofilaments are loosely arranged within discrete clusters at midcell. This model was suggested by 3D SIM experiments performed with *B. subtilis* and *S. aureus* and supported by PALM studies per-

formed with *E. coli* and *C. crescentus* (16, 18, 19), but it has not been investigated in detail with ovococci. In addition, the large majority of these studies used merodiploid bacterial strains expressing the native copy of FtsZ and a fluorescently labeled ectopic copy, an experimental condition that may have induced division defects and led to the observation of structural artifacts. In our work, we have imaged in parallel the Z-ring in a merodiploid strain and in a strain expressing a single labeled FtsZ copy expressed at wild-type levels under the native FtsZ promoter. Our PALM images reveal the highly granular assembly of FtsZ, particularly visible in predivisional septal and peripheral Z-rings at stages i and iii, respectively, which is in contrast to the homogeneous and smooth appearance of the pneumococcal Z-ring usually obtained by conventional fluorescence microscopy (29). At stage ii of the cell cycle, FtsZ clusters are still present but are less dispersed within the ring. The similarity between the granular aspect obtained with the pneumococcal strains expressing the ectopic or the endogenous spDendra2-labeled FtsZ protein indicates that the clustered patterns of the Z-ring do not result from overexpression or malfunction of the FtsZ fusion proteins. Notably, in recent 3D SIM imaging of pneumococcal FtsZ, the heterogeneous fluorescence of the Z-ring appears in agreement with results of our PALM study (17, 22, 23). Our data argue against a model in which FtsZ molecules form a homogeneous and tightly packed ring and rather support the “patchy band” model. More generally, the coherence between our results, performed with an ovococcus model, and superresolution studies performed with two other bacterial morphological models (cocci and bacilli) indicates that the heterogeneous and clustered arrangement of the Z-ring throughout the cell cycle is conserved between species with different shapes and division modes. Of note, we never observed the helical patterns previously reported for the *E. coli* Z-ring (16).

**Composition and assembly of a clustered pneumococcal Z-ring.** The granular arrangement of the Z-ring in our PALM images is further supported by the fact that the septal region of a pneumococcal cell does not contain enough FtsZ molecules to allow the assembly of a tightly packed Z-ring of 95-nm width. Indeed, as estimated by immunoblotting (Fig. S2E), the strain that we used for our work expresses ~3,500 copies of the endogenous FtsZ-spDendra2 fusion protein, with ~50% (i.e., ~1,750 molecules) of them being located at midcell during early division. Given the 4-nm length of a subunit in an FtsZ filament (3) and the ~930-nm diameter of predivisional Z-rings in *S. pneumoniae* (Fig. 5B), 1,750 septal FtsZ molecules may form a continuous filament of 7,000-nm length, encircling the division site 2 to 3 times. Pneumococcal FtsZ polymerizes *in vitro* as 5-nm-wide filaments (Fig. S7 and Text S1). The width of 2 to 3 protofilaments arranged side by side as a monolayer therefore ranges between 10 and 15 nm, which is much lower than the average 95-nm value measured for the axial thickness of the predivisional Z-ring, even taking into account the broadening effect due to our ~38-nm resolution. Although it is not yet possible to calculate precisely how many protofilaments compose the Z-ring based on the measurement of its thickness, we can reasonably propose that the pneumococcal Z-ring cannot be made of homogeneously and tightly packed FtsZ filaments. Now that several studies performed with the three main morphological models (bacilli, cocci, and ovococci) have established that FtsZ assembles as a heterogeneous and clustered divisional ring, it will be important to determine the organization of the FtsZ filaments within the clusters. The fact that



**FIG 7** Model of the nanostructure of the Z-ring in the cell cycle of ovococci. At the onset of a division cycle, FtsZ molecules (represented as light-pink squares) polymerize and form heterogeneous clusters, which are distributed within an  $\sim 95$ -nm-thick ring-like structure (the so-called Z-ring) at midcell. Three alternative paths are then proposed. In the first path (1), the predivisional Z-ring directly proceeds to constriction. In the second path (2), the single predivisional ring duplicates into two functional rings that progressively separate as the cell wall is synthesized at the division site (interpeak distances ranging from 50 to 300 nm). Upon constriction, the distance separating the double Z-rings decreases, and the unresolved rings are eventually imaged as an  $\sim 127$ -nm-thick single ring at midcell. In both paths, the FtsZ molecules start disassembling from the parental division site at stage iii and two new predivisional Z-rings appear at the future division sites of the daughter cells. Each newborn daughter cell will eventually display a single stage i Z-ring. In the third path (3), double rings are not functional for division and they are potentially resolved by an unknown proofreading or stress response mechanism. Blue boxes frame regions that have been magnified to illustrate the heterogeneous and clustered arrangement of the Z-ring, the splitting of the predivisional Z-ring before constriction, and the thickening of the apparent single Z-ring at stage ii. Dimensions measured in this work are indicated. Purple-red areas represent regions with high FtsZ density (FtsZ clusters). These regions have been magnified to illustrate the presence of FtsZ filaments (pink rectangles), potentially connected by FtsZ partners (green triangles). Gray areas represent regions of cell wall synthesis.

tilted Z-rings display a homogeneous thickness along the periphery of the ring suggests that the radial diameter of the Z-ring is approximately of the same dimension as the axial diameter, within our  $\sim 38$ -nm resolution limit. This observation therefore supports a model in which FtsZ filaments assemble in both the axial and the radial dimension to form three-dimensional clusters (Fig. 7). The mechanism by which FtsZ clusters assemble remains to be deciphered. Lateral interactions between FtsZ filaments might participate in the formation of clusters, but so far, only doublets of FtsZ filaments have been detected *in vivo* (7). Alternatively, FtsZ-interacting proteins might establish connections between FtsZ filaments, thereby inducing cluster formation and stabilization. Among the dozen FtsZ-interacting partners that have been identified so far (25), only five (FtsA, SepF, ZapA, EzrA, and FtsEX) are conserved in *S. pneumoniae*. Some of these proteins may be involved in the assembly of pneumococcal FtsZ filaments into clusters.

The FtsZ clusters in our images are separated by low-density regions in which the concentration of FtsZ molecules is not significantly different from the cytoplasmic one. This observation suggests that the Z-ring might be discontinuous. However, be-

cause we imaged only 20% of the FtsZ molecules, we cannot exclude the possibility that the clusters are connected by very low concentrations of FtsZ filaments. In the future, it will be very interesting to determine the mechanism underlying the variations in FtsZ density within the ring.

**Variation in the Z-ring nanostructure throughout the cell cycle in ovococci.** Previous superresolution studies indicate that predivisional Z-rings in *E. coli* and *C. crescentus* display an axial thickness of  $\sim 110$  and  $\sim 71$  nm, respectively (16, 19). In pneumococcal predivisional cells, we observed Z-rings with an  $\sim 95$ -nm axial thickness. The difference between the values obtained for these three bacterial species with very different shapes suggests that the axial thickness of the Z-ring might be governed by physical constraints imposed by cell shape. Alternatively, proteins involved in the assembly and placement of the Z-ring might play an important role. *S. pneumoniae* is devoid of the canonical systems for Z-ring positioning, but recently, it was shown that the protein MapZ (midcell-anchored protein Z) forms ring structures at the cell equator before FtsZ and positions the Z-ring through direct protein-protein interactions (22, 41). Therefore, MapZ might have a role in the regulation of the Z-ring's thickness. On the other hand, the other positive FtsZ regulators (FtsA, ZapA, SepF, and FtsEX) may also be involved in the regulation of the Z-ring's dimensions.

Our data reveal that the axial thickness of the pneumococcal Z-ring increases by  $\sim 32$  nm upon constriction. This variation is below the limit of the diffraction of light, which is why it has never been detected using conventional microscopy. Controversial data regarding the variation of the Z-ring dimensions throughout the *C. crescentus* cell cycle have been reported. While Biteen et al. reported an  $\sim 25$ -nm increase in the axial-Z-ring's thickness of one constricting cell (14), no variation was observed by Holden et al. (19), who performed their study on hundreds of cells. In *E. coli*, the dimensions of the Z-ring throughout the cell cycle have not yet been reported. Additional studies performed on different morphological groups of bacteria will be valuable to determine whether the thickening of the Z-ring during constriction is a general feature or is specific to ovococci.

The mechanism by which the pneumococcal Z-ring thickens upon constriction remains to be elucidated. It does not result from the additional recruitment of FtsZ molecules since the number of septal FtsZ molecules remains constant between stage i and stage ii, consistent with previous work from Strauss et al. showing that the amount of fluorescence remains constant during constriction in *B. subtilis* cells expressing an endogenous FtsZ-GFP fusion (18). Notably, this observation also indicates that the constriction of the Z-ring does not require the progressive loss of FtsZ molecules in the ring. On the other hand, the Z-ring width might increase to compensate for the decrease in its diameter, allowing the toroidal volume to remain constant. However, variations in toroidal volume cannot be discussed based on our PALM data because we could not observe any tilted Z-ring at stage ii of the cell cycle, and we therefore do not know whether the radial width of the Z-ring varies during constriction. An intriguing observation, which is the presence of double Z-rings in predivisional cells, might actually provide important clues regarding the mechanism through which the Z-ring thickens. This mechanism is discussed in the next section.

**Pneumococcal FtsZ forms double rings.** In 4% of the cells, we observed double Z-rings that were never reported for any other

bacterial species. These double Z-rings might represent abnormal localizations that assemble either randomly or in response to stress. These structures might then get corrected by a mechanism ensuring the assembly and stabilization of a single annular Z-ring at midcell, and this possibility is integrated in the model proposed in Fig. 7. StkP, GpsB, or MapZ might participate as such a proof-reading mechanism, as cells expressing a deficient StkP or cells lacking GpsB or MapZ display aberrant FtsZ patterns (22, 31, 41, 42).

The double Z-rings observed here, however, display several characteristics supporting the hypothesis that they might be functional and constitute an intermediate step in constriction. First, they are the only atypical FtsZ localization patterns that we detected in our PALM images, while one might expect nonfunctional FtsZ assemblies to adopt more-various structures. Second, double rings are never observed at the equatorial positions of cells at stage iii. Third, the ~853-nm diameter of these double Z-rings is in the range of stage i predivisional ring diameters. Fourth, the total number of imaged FtsZ-spDendra2 molecules in the double rings corresponds to the number of molecules that are imaged in stage i single rings. Fifth, the distance separating the double rings ranges between ~50 and 300 nm, which fits in the ~300-nm distance separating the double rings of MapZ, the recently discovered FtsZ positioning protein (22). All together, these data suggest that the double Z-rings might correspond to a physiological intermediate structure, possibly building up just before constriction, between stage i and stage ii (Fig. 7). In this model, the predivisional single Z-ring (stage i) has to undergo splitting through a mechanism that remains to be deciphered. As was proposed for the splitting of the equatorial MapZ ring (22), initial cell wall synthesis performed by the division or the elongation machinery may allow splitting of the predivisional Z-ring and separation of the double rings.

Our model predicts that the axial thickness of the Z-ring in unconstricted cells should increase until the two rings are distinguishable and then decrease again as the two rings merge. The values obtained for the Z-ring's axial thickness and for the distance separating the double rings are in agreement with this prediction. Indeed, the axial thickness of the Z-ring in unconstricted cells ranges from ~75 to ~210 nm; this variability might therefore arise from the progressive separation or merging of unresolved rings. In addition, the double rings are separated by various distances (~50 to 300 nm), which potentially correspond to different stages in the separation or merging process. Finally, at stage ii of the cell cycle, we did not detect the presence of double Z-rings, possibly because they have merged or because the invagination of the cytoplasmic membrane has reduced the distance between the double Z-rings to a value below our resolution limit. The potential presence of unresolved double Z-rings at stage ii might explain why we see a thickening of the apparent single Z-ring at this stage. In our model, we therefore propose that the thickening of the Z-ring during constriction might result from the juxtaposition of two unresolved Z-rings.

In the future, PALM studies of the Z-ring in *mapZ* mutants, in mutants impaired for septal or peripheral cell wall synthesis, or in the presence of  $\beta$ -lactam antibiotics will be required to test our model and elucidate the mechanism of double-Z-ring formation and separation.

**Conclusions.** The nanostructural details provided in this work are consistent with a model (Fig. 7) in which, at the onset of the cell

cycle, FtsZ filament clusters form an ~95-nm-thick ring-like structure stabilized by FtsZ-interacting partners and are potentially connected by low concentrations of FtsZ filaments. The observation of a double-Z-ring phenotype in a small fraction of the population suggests that the predivisional Z-ring might then separate into two rings, an event possibly induced by the initiation of cell wall synthesis at midcell. The two Z-rings would then come close to each other during constriction and eventually disassemble from the parental division site while two new predivisional Z-rings appear at the future division sites of the daughter cells. Alternatively, the double Z-rings might constitute a nonfunctional state that occurs either randomly or in response to stress. This work is a first step toward the elucidation of the remodeling mechanisms of the Z-ring throughout the cell cycle in ovococci. Further investigations will require imaging of the Z-ring in pneumococcal cells lacking or depleted of proteins involved in Z-ring assembly, stabilization, and positioning, such as FtsA, ZapA, SepF, EzrA, GpsB, or MapZ. Finally, the presented data on *S. pneumoniae* should motivate the use of PALM in other pathogenic cocci like enterococci or staphylococci.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and plasmids.** Tables of strains, plasmids, and oligonucleotide primers and descriptions of their constructions can be found in Table S1 in the supplemental material. The spDendra2 synthetic gene was ordered from GeneArt Gene Synthesis (Life Technologies). Allelic replacements were performed using the Janus method as described previously (42). Briefly, we used a two-step procedure based on a bicistronic *kan-rpsL* cassette called Janus (43) to replace the *ftsZ* gene with the *ftsZ*-spDendra2 gene fusion form. This method avoids polar effects and allows expression of the fusion proteins at physiological levels.

**Growth conditions, media, and bacterial transformation.** Liquid cultures of *S. pneumoniae* strains were grown at 37°C in C medium supplemented with 0.5% yeast extract (CY) (44) or in Todd Hewitt medium (TH; BD Sciences). For strains harboring a zinc-inducible plasmid, CY was supplemented with 0.15 mM ZnCl<sub>2</sub> for expression of the fusion proteins. For transformation, ~250 ng of DNA was added to cells treated with synthetic competence stimulating peptide 1 in TH supplemented with 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Cells were grown for 2 h at 37°C, and transformants were selected on Columbia blood (4%) agar plates containing the appropriate antibiotics (tetracycline, 2.5  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; streptomycin, 200  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; or kanamycin, 250  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

**Immunoblot analysis.** *S. pneumoniae* cells grown at 37°C in CY were harvested at an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.3, concentrated 30-fold in Laemmli buffer supplemented with 20  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  DNase, and heated to 95°C for 5 min. Whole-cell extracts and dilutions of recombinant pneumococcal FtsZ (purified as described in the previous paragraph) were then loaded onto 12.5% polyacrylamide precast gels (Bio-Rad), resolved by SDS-PAGE, and electroblotted onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked in phosphate-buffered saline (PBS)–0.03% Tween 20 with 5% nonfat milk and probed with rabbit anti-FtsZ serum (29) diluted 1:10,000 in PBS–0.03% Tween 20 with 3% bovine serum albumin (BSA). Primary antibodies were detected using horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:10,000; Sigma-Aldrich) and the enhanced-chemiluminescence (ECL) Western blotting reagent kit as described by the manufacturer (Thermo Scientific Pierce). For determination of the FtsZ cellular concentration, the intensity of the bands was quantified using ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) and the recombinant pneumococcal FtsZ samples were used as the reference samples.

**Conventional fluorescence microscopy image acquisition and analysis.** Cells were grown at 37°C in CY to an OD<sub>600</sub> of 0.3, transferred to microscope slides, and observed at room temperature using an Olympus BX61 optical microscope equipped with a UPFLN 100 $\times$  O-2PH/1.3 ob-

jective and a QImaging Retiga-SRV 1394 cooled charge-coupled-device (CCD) camera. Images were acquired using the Volocity software package. Image analysis was performed using MicrobeTracker Matlab software (45).

**PALM setup and acquisition method.** *S. pneumoniae* cultures used for live- and fixed-cell imaging were grown at 37°C in CY depleted of riboflavin until an OD<sub>600</sub> of 0.3 was reached. For live-cell imaging, cells were transferred to Gelzan (Sigma-Aldrich) pads containing C medium. For fixed-cell imaging, cells were fixed for 30 min at 20°C in the culture medium containing 2% paraformaldehyde and washed three times with PBS before transfer to thoroughly cleaned microscopy slides (Star-Frost; Light Labs.). We verified that these fixation conditions did not impair Z-ring functioning. First, we showed that *S. pneumoniae* cells grown at 37°C are able to divide without any lag time when placed on agarose or Gelzan pads at 20°C (Fig. S2A); second, we checked that all cells fixed under these conditions display a septal Z-ring (Fig. 2A); and third, we verified that Z-rings display similar features when cells are fixed at 37°C using 1% paraformaldehyde. For fixed-cell imaging, gravity was sufficient to obtain fields of immobile bacteria lying on the same focus plane at the surfaces of microscope slides. Images were acquired at 20°C with a home-built PALM setup based on an Olympus IX81 microscope (Olympus, Japan) and equipped with diode-pumped solid-state lasers at 405 nm (CrystaLaser), 488 nm (Spectra-Physics), and 561 nm (Cobolt, Jena). Wide-field illumination was achieved by focusing the circularly polarized laser beams to the back focal plane of a 100× 1.49-numerical-aperture (NA) oil immersion apochromatic objective lens (Olympus). The intensity and time sequence of laser illumination at the sample was tuned by an acousto-optical tunable filter (AOTF; Quanta Tech). To prevent sample drift during data acquisition, the samples were placed on an IX2-NPS nosepiece stage (Olympus) fixed directly on the objective. Fluorescence images were acquired with an Evolve back-illuminated electron micrograph CCD camera (Photometrics) controlled by the MetaMorph software (Molecular Devices). For PALM data collection, spDendra2 photoconversion was achieved at 405 nm by ramping up the power density from 1% to 100% of a typical maximum value of 14.4 W · cm<sup>-2</sup>, so as to counterbalance for the decrease of the available pool of nonphotoconverted molecules. Excitation of red photoconverted spDendra2 was performed at 561 nm with a typical power density of 8.8 × 10<sup>3</sup> W · cm<sup>-2</sup> at beam center, which was adjusted so that most molecules were imaged and photobleached within 1 to 2 frames (Fig. S2D). Images were collected until photoconversion of spDendra2-FtsZ molecules became very infrequent, which usually happened after ~5,000 frames (Fig. S2C). To minimize autofluorescence induced by near-UV light illumination, PALM data sets were acquired using an alternate illumination scheme (Fig. S2B) consisting of 405-nm illumination periods of 21 ms (for fixed cells) or 10 ms (for live cells) for photoconversion, followed by 561-nm illumination readout periods of 30 ms or 15 ms for fixed and live cells, respectively.

**General data processing and statistical analysis.** All data processing was realized with Matlab (MathWorks). In order to test for statistical significance, *P* values were obtained by performing Student tests on all analyses. We set the significance level of our analyses to 1%.

**PALM image reconstruction.** Localizations of spDendra2-FtsZ molecules were determined by Gaussian least-squares fitting (26, 46). A mean localization precision of ~22 nm was typically found, and the detected photon budget per molecule was calculated to be ~420 photons/mol. Image rendering and molecular counting correcting for spDendra2 blinking was realized with homemade Matlab routines as described by Avilov et al. (26). Image rendering was realized by blurring each localization by convolution with a 2D Gaussian profile with the full width at half-maximum (FWHM) equal to the localization precision and by final binning with a pixel size of 8 nm. The spatial resolution of the reconstructed PALM images was estimated using the method of S. H. Shim et al. (47); the number of molecules (*N*) within segmented areas (*A*, typically Z-ring cross sections) was calculated, and the mean Nyquist resolution was given

by  $r \approx (2\sqrt{NA})$ . Using that method, and averaging over 56 Z-rings of cells at stage i, we found a resolution of ~38 nm.

**Counting of imaged spDendra2 molecules.** Molecular counting was performed according to the method described by Avilov et al. (26). Briefly, we corrected for spDendra2 blinking by using an upgraded version of the clustering optimization procedure proposed by Lee et al. (27), in which the photophysical behavior of spDendra2 was iteratively extracted from the experimental data itself. Under our experimental conditions, spDendra2 exhibited a photobleaching quantum yield of  $\sim 2.6 \times 10^{-5}$ , a blinking-off quantum yield of  $\sim 7.4 \times 10^{-6}$ , and a blinking-on rate of  $\sim 14.8 \text{ s}^{-1}$ . Perhaps due to the specific environment encountered in *S. pneumoniae* cells, the blinking behavior of spDendra2 was found to be significantly reduced compared to that from our previous observations in mammalian cells (26). Of note, the number of imaged FtsZ-spDendra2 molecules was not significantly different when fixation was performed at 37°C using 1% paraformaldehyde.

**Analysis of Z-ring geometry.** Using MicrobeTracker, each cell was manually selected and oriented with the longitudinal cell axis parallel to the *x* axis. The pixel intensities along the *y* axis were then averaged and plotted against the *x* axis. Using a homemade Matlab script, the intensity plot was then fitted with a Gaussian function to measure the width at half-maximum of the peak, which was used as the axial thickness of the corresponding Z-ring.

**PALM imaging simulation.** Simulation of PALM imaging was performed as previously described (26), with the following modifications. 2D areas with dimensions corresponding to mean diameter and axial thickness values of the Z-ring imaged at stages i, ii, and iii of the cell cycle were designed under ImageJ. Using our Matlab-based simulation software (26), the experimental number of molecules imaged at each stage was randomly introduced into these 2D areas, with the same background levels as in the experiments. Simulation of the stochastic activation and imaging of these molecules were then performed as described in reference 26, and the simulated PALM image was reconstructed using the same scripts and parameters that were used to process experimental PALM data.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <http://mbio.asm.org/lookup/suppl/doi:10.1128/mBio.01108-15/-/DCSupplemental>.

Text S1, PDF file, 0.1 MB.  
Figure S1, TIF file, 1.1 MB.  
Figure S2, TIF file, 1 MB.  
Figure S3, TIF file, 1.4 MB.  
Figure S4, TIF file, 2 MB.  
Figure S5, TIF file, 0.9 MB.  
Figure S6, TIF file, 0.5 MB.  
Figure S7, TIF file, 2.8 MB.  
Table S1, PDF file, 0.1 MB.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work used the platforms of the Grenoble Instruct center (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (grant ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (grant ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). Support for this work comes in part from the Agence Nationale de la Recherche (grants ANR-2011-BSV5-012-01 NOBLEACH and ANR-11-BSV8-005-01 PILIPATH) and the University of Grenoble Alpes. M.J. was funded by a Ph.D. grant from the Labex GRAL (Alliance Grenobloise pour la Biologie Structurale et Cellulaire Intégrées).

We thank M. Nollmann, D. Catoni, C. Grangeasse, T. Doan, and A. Zapun for useful discussions regarding PALM techniques and data. We are grateful to C. Grangeasse for providing us with the *ftsZ* Janus intermediate strain (*ftsZ-kan-rpsL*).

## REFERENCES

- Löwe J, Amos LA. 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* 391:203–206. <http://dx.doi.org/10.1038/34472>.

2. 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* 26:4694–4708. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601895>.
3. Erickson HP, Anderson DE, Osawa M. 2010. FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:504–528. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00021-10>.
4. Adams DW, Errington J. 2009. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol* 7:642–653. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2198>.
5. Egan AJ, Vollmer W. 2013. The physiology of bacterial cell division. *Ann N Y Acad Sci* 1277:8–28. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06818.x>.
6. Lan G, Daniels BR, Dobrowsky TM, Wirtz D, Sun SX. 2009. Condensation of FtsZ filaments can drive bacterial cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:121–126. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0807963106>.
7. Szewdziaik P, Wang Q, Bharat TA, Tsim M, Löwe J. 2014. Architecture of the ring formed by the tubulin homologue FtsZ in bacterial cell division. *Elife* 3:e04601. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.04601>.
8. Hsin J, Gopinathan A, Huang KC. 2012. Nucleotide-dependent conformations of FtsZ dimers and force generation observed through molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:9432–9437. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1207611109>.
9. Li Y, Hsin J, Zhao L, Cheng Y, Shang W, Huang KC, Wang HW, Ye S. 2013. FtsZ protofilaments use a hinge-opening mechanism for constrictive force generation. *Science* 341:392–395. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1239248>.
10. Osawa M, Anderson DE, Erickson HP. 2008. Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. *Science* 320:792–794. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1154520>.
11. Osawa M, Anderson DE, Erickson HP. 2009. Curved FtsZ protofilaments generate bending forces on liposome membranes. *EMBO J* 28:3476–3484. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.277>.
12. Meier EL, Goley ED. 2014. Form and function of the bacterial cytokinetic ring. *Curr Opin Cell Biol* 26:19–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cob.2013.08.006>.
13. Ma X, Ehrhardt DW, Margolin W. 1996. Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12998–13003. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.23.12998>.
14. Biteen JS, Goley ED, Shapiro L, Moerner WE. 2012. Three-dimensional super-resolution imaging of the midplane protein FtsZ in live *Caulobacter crescentus* cells using astigmatism. *Chemphyschem* 13:1007–1012. <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201100686>.
15. Buss J, Coltharp C, Huang T, Pohlmeier C, Wang SC, Hatem C, Xiao J. 2013. In vivo organization of the FtsZ-ring by ZapA and ZapB revealed by quantitative super-resolution microscopy. *Mol Microbiol* 89:1099–1120. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12331>.
16. Fu G, Huang T, Buss J, Coltharp C, Hensel Z, Xiao J. 2010. In vivo structure of the *E. coli* FtsZ-ring revealed by photoactivated localization microscopy (PALM). *PLoS One* 5:e12682. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012680>.
17. Land AD, Tsui HC, Kocaoglu O, Vella SA, Shaw SL, Keen SK, Sham LT, Carlson EE, Winkler ME. 2013. Requirement of essential Pbp2x and GpsB for septal ring closure in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol* 90:939–955. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12408>.
18. 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:e1001389. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001389>.
19. Holden SJ, Pengo T, Meibom KL, Fernandez C, Collier J, Manley S. 2014. High throughput 3D super-resolution microscopy reveals *Caulobacter crescentus* in vivo Z-ring organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:4566–4571. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1313368111>.
20. Zapun A, Vernet T, Pinho MG. 2008. The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol Rev* 32:345–360. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00098.x>.
21. Massidda O, Nováková L, Vollmer W. 2013. From models to pathogens: how much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division? *Environ Microbiol* 15:3133–3157. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12189>.
22. 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. 2014. MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* 516:259–262. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13966>.
23. Tsui HC, Boersma MJ, Vella SA, Kocaoglu O, Kuru E, Peceny JK, Carlson EE, VanNieuwenhze MS, Brun YV, Shaw SL, Winkler ME. 2014. Pbp2x localizes separately from Pbp2b and other peptidoglycan synthesis proteins during later stages of cell division of *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol* 94:21–40. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12745>.
24. Lutkenhaus J, Pichoff S, Du S. 2012. Bacterial cytokinesis: from Z ring to divisome. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69:778–790. <http://dx.doi.org/10.1002/cm.21054>.
25. Huang KH, Durand-Heredia J, Janakiraman A. 2013. FtsZ ring stability: of bundles, tubules, crosslinks, and curves. *J Bacteriol* 195:1859–1868. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.02157-12>.
26. Avilov S, Berardozi R, Gunewardene MS, Adam V, Hess ST, Bourgeois D. 2014. In cellulo evaluation of phototransformation quantum yields in fluorescent proteins used as markers for single-molecule localization microscopy. *PLoS One* 9:e98362. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098362>.
27. Lee SH, Shin JY, Lee A, Bustamante C. 2012. Counting single photoactivatable fluorescent molecules by photoactivated localization microscopy (PALM). *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:17436–17441. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1215175109>.
28. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22:1567–1572. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1037>.
29. Morlot C, Bayle L, Jacq M, Fleurie A, Tourcier G, Galisson F, Vernet T, Grangeasse C, Di Guilmi AM. 2013. Interaction of penicillin-binding protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in *Streptococcus pneumoniae* R6 morphogenesis. *Mol Microbiol* 90:88–102. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12348>.
30. Morlot C, Zapun A, Dideberg O, Vernet T. 2003. Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol Microbiol* 50:845–855. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03767.x>.
31. 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. 2014. Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. *PLoS Genet* 10:e1004275. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004275>.
32. 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* 55:699–711. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04432.x>.
33. Puchner EM, Walter JM, Kasper R, Huang B, Lim WA. 2013. Counting molecules in single organelles with superresolution microscopy allows tracking of the endosome maturation trajectory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:16015–16020. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1309671110>.
34. Durisic N, Laparra-Cuervo L, Sandoval-Álvarez A, Borbely JS, Lakadamyali M. 2014. Single-molecule evaluation of fluorescent protein photoactivation efficiency using an *in vivo* nanotemplate. *Nat Methods* 11:156–162. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2784>.
35. Stricker J, Maddox P, Salmon ED, Erickson HP. 2002. Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3171–3175. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.052595099>.
36. 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* 186:5775–5781. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.17.5775-5781.2004>.
37. Chen Y, Erickson HP. 2005. Rapid in vitro assembly dynamics and subunit turnover of FtsZ demonstrated by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 280:22549–22554. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M500895200>.
38. Ester M, Kriegel H-P, Sander J, Xu X. 1996. A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. *Proceedings of 2nd International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*. Association for the Advancement of Artificial Intelligence (AAAI), Palo Alto, California, USA. <https://www.aaai.org/Papers/KDD/1996/KDD96-037.pdf>.

39. Huang B, Jones SA, Brandenburg B, Zhuang X. 2008. Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution. *Nat Methods* 5:1047–1052. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1274>.
40. Milam SL, Osawa M, Erickson HP. 2012. Negative-station electron microscopy of inside-out FtsZ rings reconstituted on artificial membrane tubules show ribbons of protofilaments. *Biophys J* 103:59–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2012.05.035>.
41. Holečková N, Doubravová L, Massidda O, Molle V, Buriánková K, Benada O, Kofroňová O, Ulrych A, Branny P. 2015. LocZ is a new cell division protein involved in proper septum placement in *Streptococcus pneumoniae*. *mBio* 6(1):e01700-14. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01700-14>.
42. 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* 83:746–758. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07962.x>.
43. Sung CK, Li H, Claverys JP, Morrison DA. 2001. An rpsL cassette, Janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* 67:5190–5196. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.11.5190-5196.2001>.
44. Lacks S, Hotchkiss RD. 1960. A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochim Biophys Acta* 39:508–518.
45. Sliusarenko O, Heinritz J, Emonet T, Jacobs-Wagner C. 2011. High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics. *Mol Microbiol* 80:612–627. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07579.x>.
46. Hess ST, Girirajan TP, Mason MD. 2006. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J* 91:4258–4272. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.091116>.
47. Shim SH, Xia C, Zhong G, Babcock HP, Vaughan JC, Huang B, Wang X, Xu C, Bi GQ, Zhuang X. 2012. Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:13978–13983. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1201882109>.

# Figure S1

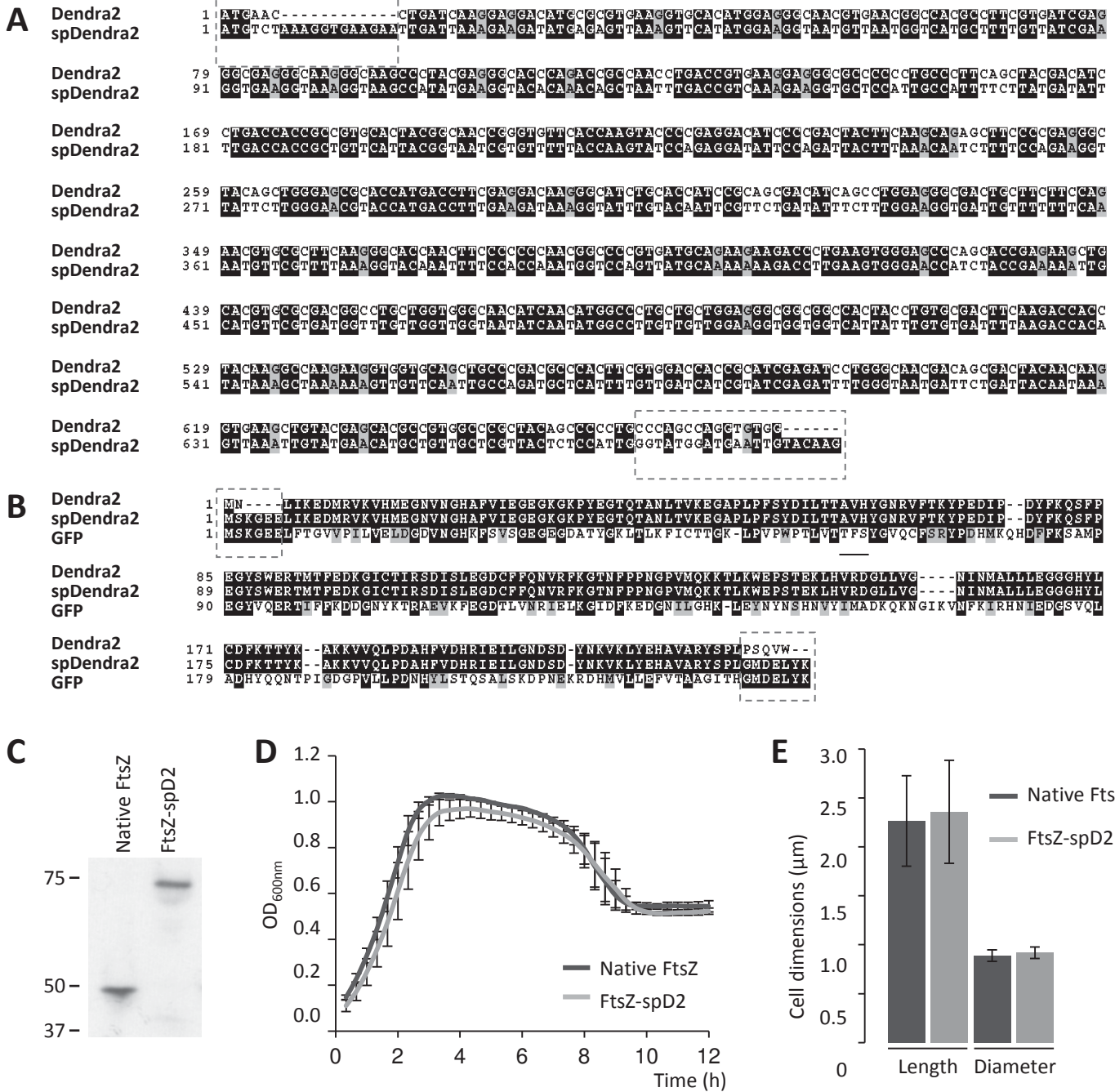


Figure S1 The fusion between FtsZ and engineered spDendra2 is functional in *S. pneumoniae*. (A) DNA sequence alignment of the Dendra2 and spDendra2 genes. (B) Amino acid sequence alignment of Dendra2, spDendra2, and GFP. Strictly conserved nucleotides and amino acids are boxed in black; pairs of purines, pyrimidines, and residues that are conserved or similar in at least two proteins in the alignment are boxed in gray. Dashed boxes indicate the modified N- and C-terminal regions. The chromophore is underlined in black. (C) Expression levels of native FtsZ (strain R6, left lane) and endogenous FtsZ-spDendra2 (FtsZ-spD2, strain spMJ40, right lane). Samples of cultures were harvested at an OD<sub>600</sub> of 0.3 for the preparation of protein extracts. Equivalent amounts of total proteins for each sample were separated by SDS-PAGE, blotted to membranes, and analyzed by immunoblotting using anti-FtsZ serum. Positions of molecular mass markers are indicated by the numbers (in kilodaltons) to the left of the blots. (D) Monitoring of the growth of strains R6 (dark-gray curve) and spMJ40 (light-gray curve). Exponentially growing cells were resuspended to a final OD<sub>600</sub> of 0.03 in TH medium, and growth was monitored at 37°C by measuring the OD<sub>600</sub> every 20 min with a multiwell plate reader (FLUOstar Optima; BMG Labtech). Experiments were performed in triplicate. (E) Average cell length and diameter (in micrometers) of strains R6 (dark-gray histograms) and spMJ40 (light-gray histograms). Error bars represent standard deviation values.



## Figure S2

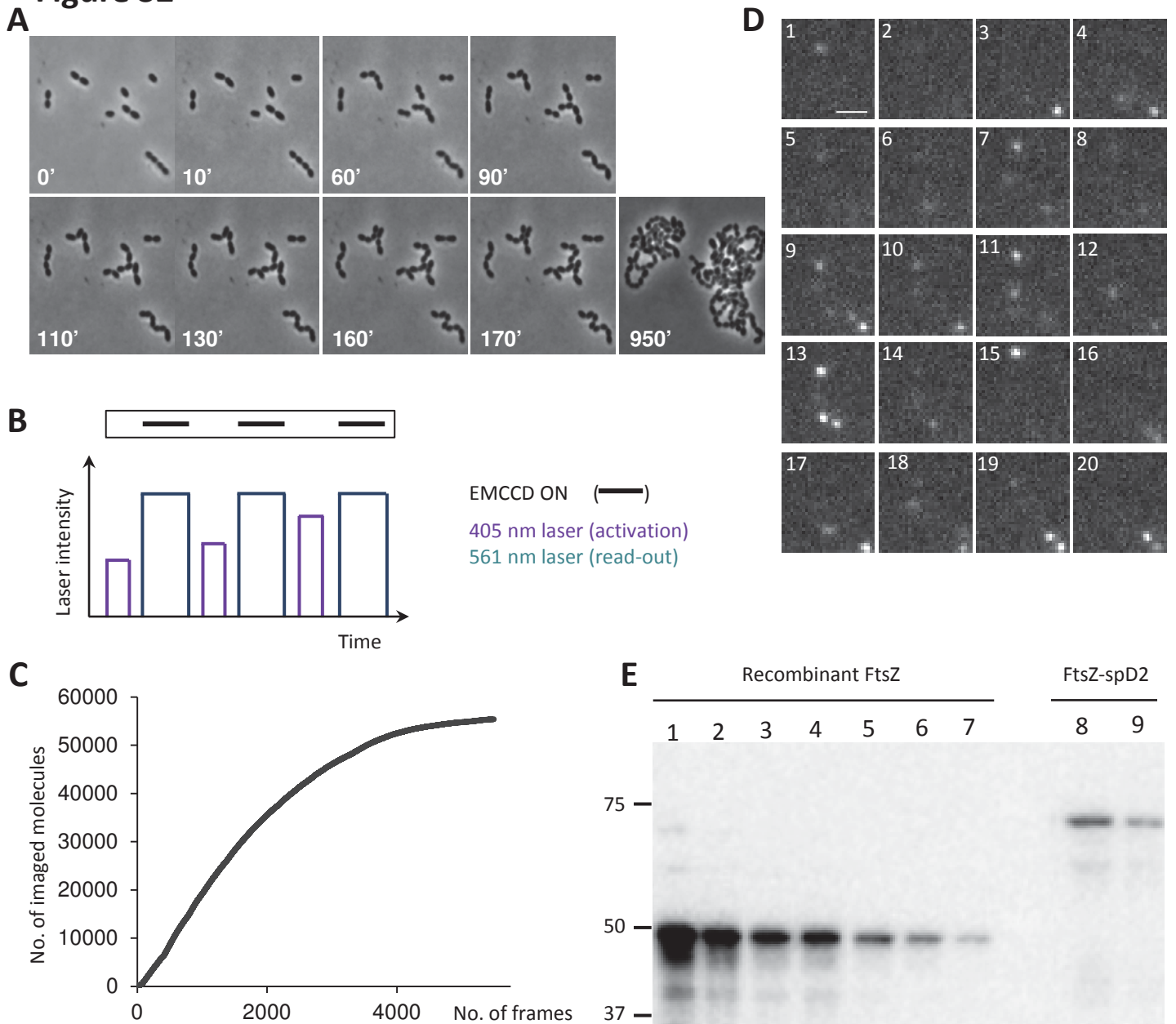
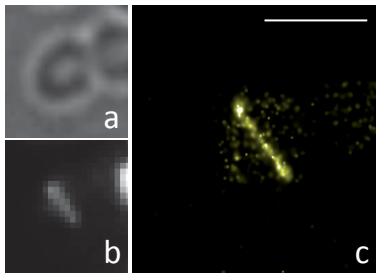


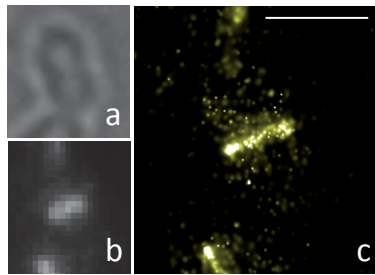
Figure S2 Characteristics of PALM data collection on FtsZ-spDendra2. (A) Phase-contrast time-lapse microscopy images of live dividing *S. pneumoniae* cells at 20°C. Cells were grown at 37°C in CY to an OD<sub>600</sub> of 0.3, were then directly transferred to agarose pads containing CY, were incubated at 20°C, and were imaged at various time points. (B) Schematic representation of PALM imaging cycles using alternative illumination with the 405-nm activation laser (purple line) and 561-nm excitation laser (cyan line). The intensity of the excitation laser was kept constant throughout the data collection, while the intensity of the activation laser was regularly increased to compensate for the bleaching of the pool of FtsZ-spDendra2 over time. (C) Cropped regions (32 by 32 pixels) of typical PALM images collected on fixed cells expressing the endogenous FtsZ-spDendra2. Each frame was collected in 30 ms. Scale bar = 1 μm. (D) Cumulative curve showing the amount of imaged FtsZ-spDendra2 molecules over time. (E) Immunoblot quantification of the number of FtsZ-spDendra2 copies in pneumococcal cells. Lanes 1 to 7, recombinant FtsZ was purified as described previously (30) and quantified by bicinchoninic acid (BCA) dosage (Pierce). From left to right, 255 ng, 128 ng, 64 ng, 51 ng, 32 ng, 25.5 ng, and 13 ng of FtsZ were loaded onto the gel. In lanes 8 to 9, cells expressing the endogenous FtsZ-spDendra2 fusion were lysed at an OD<sub>600</sub> of 0.3 in Laemmli buffer supplemented with DNase, RNase, and a protease inhibitor (Complete; Roche). Ten microliters and 5 μl were loaded onto the gel in lanes 8 and 9, respectively. Proteins were separated by SDS-PAGE, blotted to membranes, and immunoblotted using anti-FtsZ serum. Positions of molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left of the blot.

## Figure S3

Stage i :



Stage ii :



Stage iii :

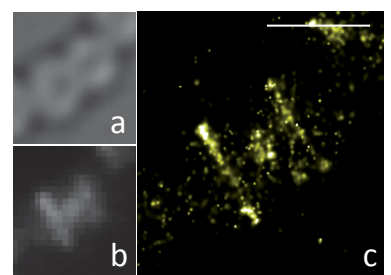
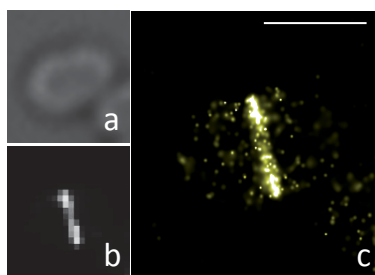
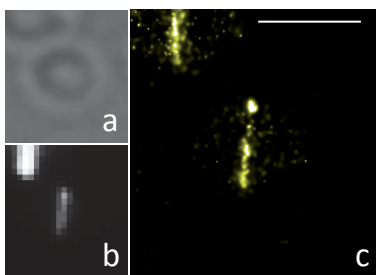
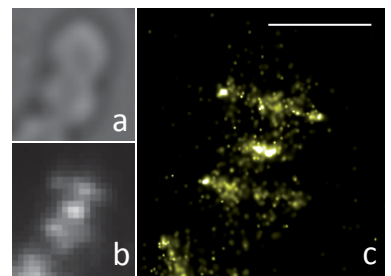
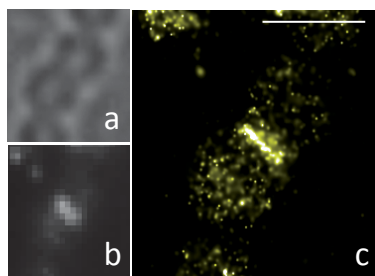
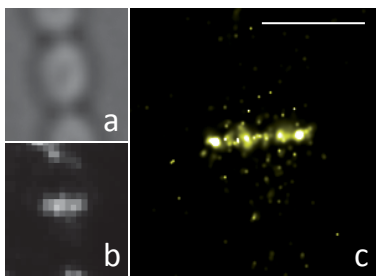
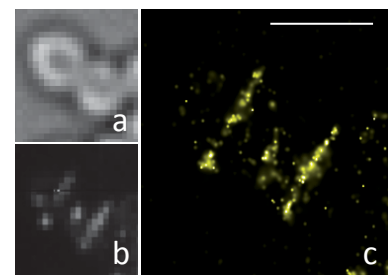
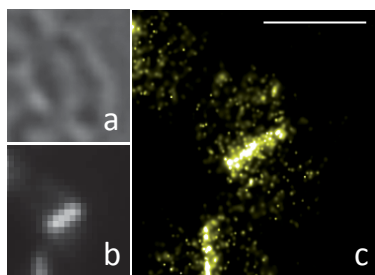
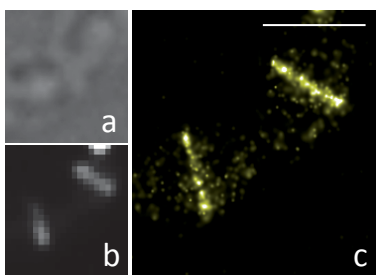
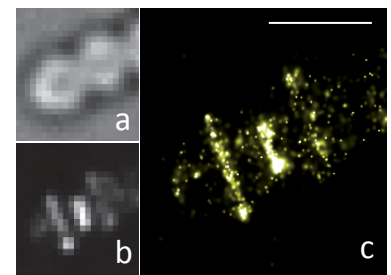
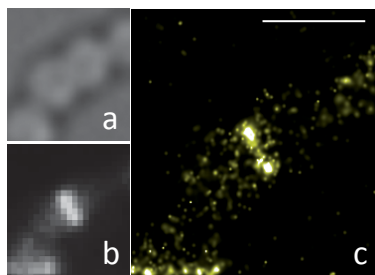
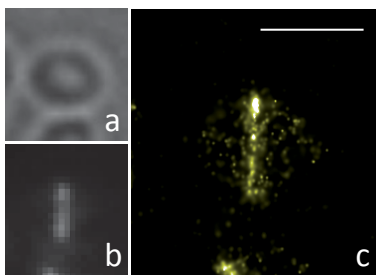
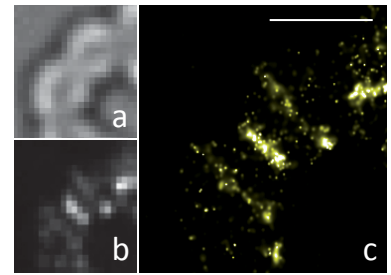


Figure S3 PALM images of representative patterns of the Z-ring throughout the pneumococcal cell cycle. Typical pneumococcal cells expressing the endogenous FtsZ-spDendra2 fusion (spMJ40) were classified into three stages defined by the diameter of the Z-ring, the cell length, and the distribution of FtsZ at the division site of the mother cell and the division sites of the two daughter cells. Cells were fixed and imaged at an  $OD_{600}$  of 0.3. Bright-field (a), diffraction-limited (b), and reconstructed PALM (c) images are shown. Scale bars = 250 nm.

## Figure S4

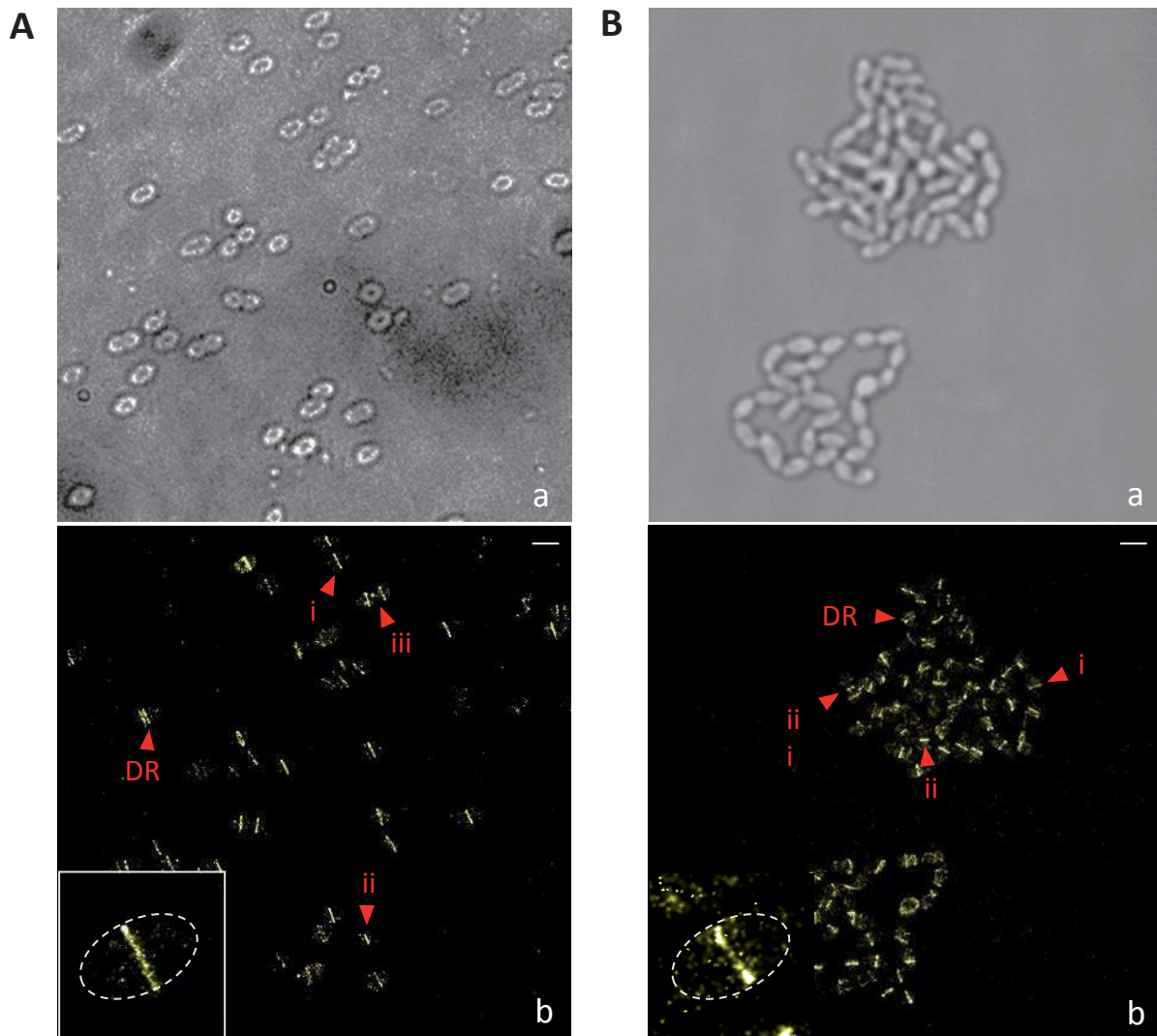


Figure S4 Large fields of *S. pneumoniae* cells expressing fusions between FtsZ and spDendra2. (A) Fixed pneumococcal cells expressing an ectopic spDendra2-FtsZ fusion (spCM72); (B) live pneumococcal cells expressing an endogenous FtsZ-spDendra2 fusion (spMJ40). Cells were either fixed or directly imaged at an  $OD_{600}$  of 0.3. Bright-field (a) and reconstructed PALM (b) images are shown. Red arrowheads point at cells in one of the three stages described in Fig. 3 or at a cell displaying a double ring (DR) of FtsZ, as illustrated in Fig. 6. Gray-boxed inset images are 5-fold magnifications of one predivisional PALM pattern displayed in panel b. Dashed gray lines represent the periphery of the cell. Scale bars = 2  $\mu\text{m}$ .

Figure S5

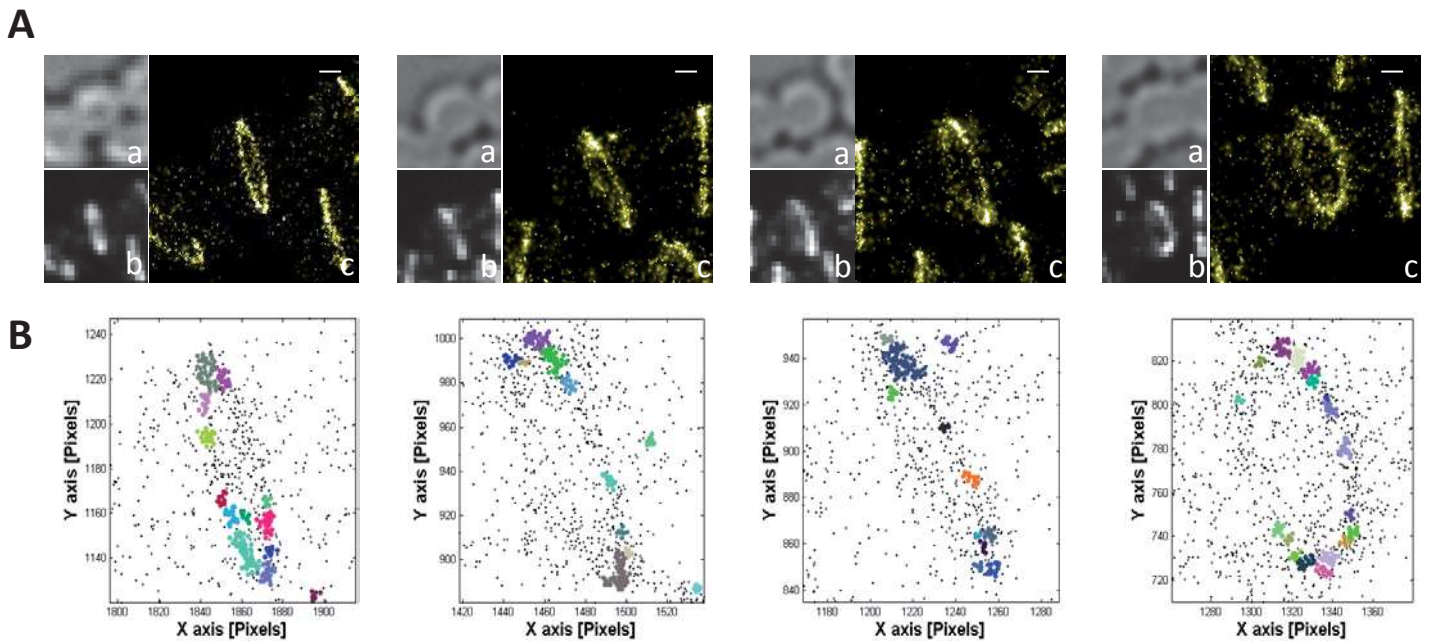


Figure S5 Cluster analysis of tilted Z-rings. (A) Tilted pneumococcal cells (spMJ40) displaying tilted rings of FtsZ-spDendra2. Cells were fixed and imaged at an  $OD_{600}$  of 0.3. Bright-field (a), diffraction-limited (b), and reconstructed PALM (c) images are shown. Scale bars = 250 nm. (B) Cluster analysis of the tilted rings shown in panel A using the DBSCAN algorithm (38). Different colors are used to visualize the different clusters. The cluster diameter threshold was set at 22 nm. Nonclustered molecules are shown as black dots.

**Figure S6**

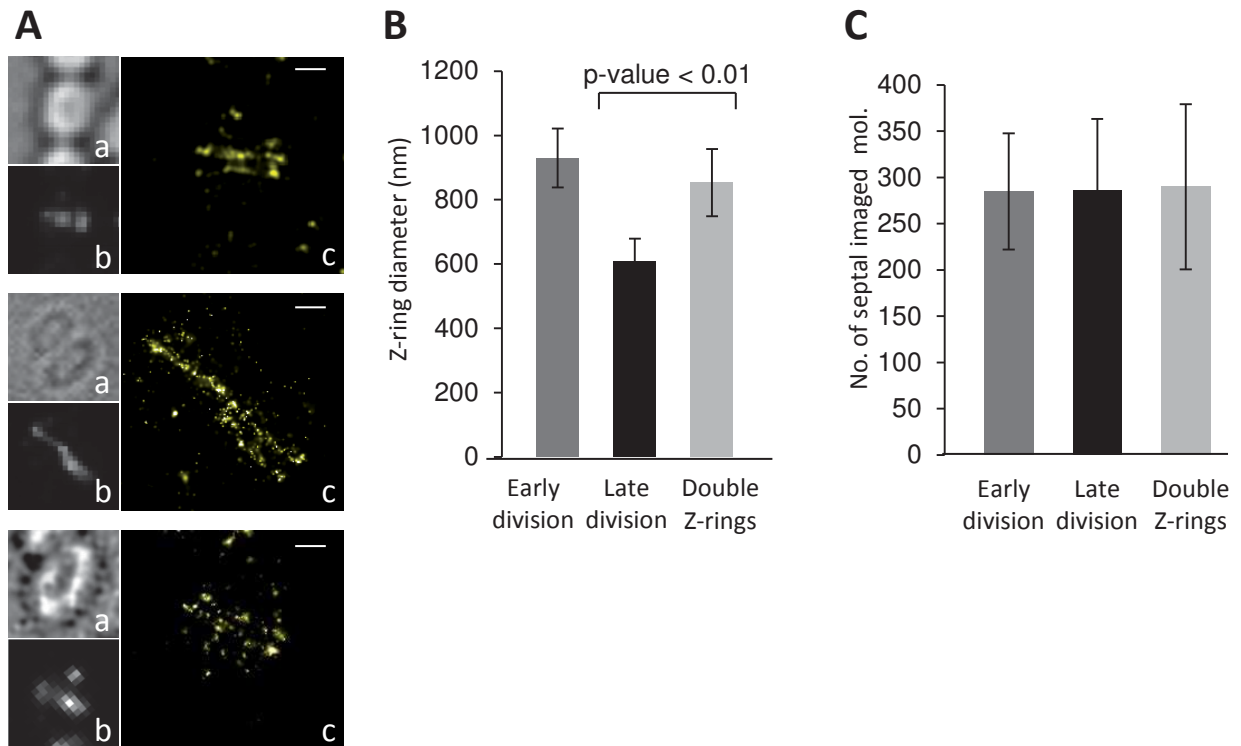


Figure S6 Pneumococcal FtsZ displays double-ring patterns. (A) Pneumococcal cells expressing an endogenous FtsZ-spDendra2 fusion (spMJ40) (top panels) or an ectopic spDendra2-FtsZ fusion (spCM72) (lower panels) were fixed and imaged at an  $OD_{600}$  of 0.3. Bright-field (a), diffraction-limited (b), and reconstructed PALM (c) images are shown. Scale bars = 250 nm. (B and C) Characterization of the double Z-rings. Mean values of the Z-ring diameter (A) and the number of imaged septal FtsZ-spDendra2 molecules (B) are reported for cells in the early (Z-ring diameter > 800 nm [dark gray]) or late (Z-ring diameter < 700 nm [black]) division stage and for cells displaying double Z-rings (light gray). Error bars represent standard deviation values.

## Figure S7

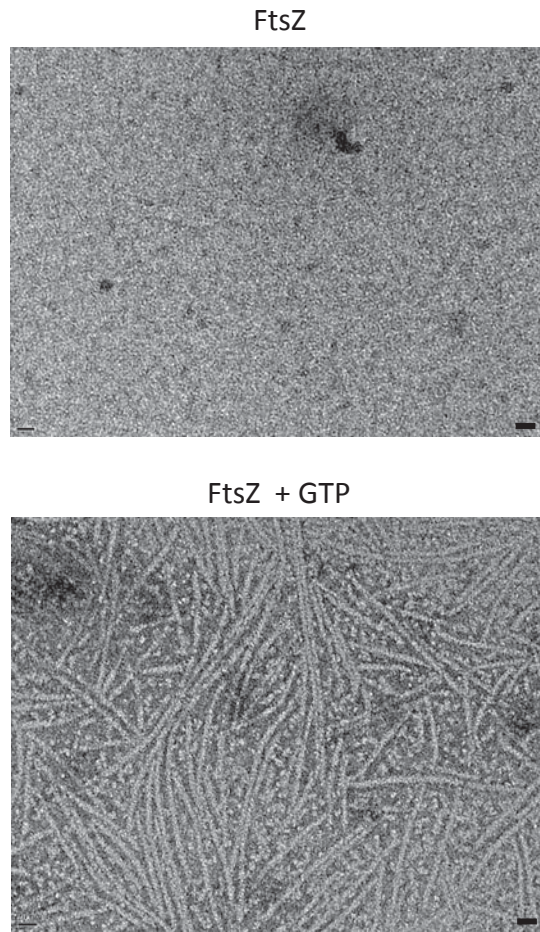


Figure S7 *In vitro* polymerization of purified recombinant pneumococcal FtsZ. Purified recombinant FtsZ (5  $\mu$ M) was incubated for 15 min at room temperature in buffer containing 50 mM HEPES pH 7.6, 200 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, in the absence (upper panel) or in the presence of 5 mM GTP. The samples were stained with uranyl acetate for electron microscopy imaging. Scale bars = 20 nm. FtsZ assembles into filaments with a broad length distribution centered on 100 nm and a homogeneous width of 5 nm

# Présentation de la publication n° II

## Contexte et objectifs de l'étude

Les hydrolases du PG sont des acteurs importants de la morphogénèse et de la division bactérienne. Chez les bacilles, l'étude de leur fonction est limitée par leur très grand nombre (plus de 30 hydrolases du PG ont été dénombrées chez *E. coli* et *B. subtilis*) et leur redondance. Le pneumocoque compte seulement 12 hydrolases du PG, dont 6 sont impliquées dans la morphogénèse et la division, comme en témoignent les anomalies de division et les sérieux défauts morphologiques qui résultent de leur inactivation. Bien que la fonction enzymatique de la plupart de ces hydrolases soit connue, leur rôle dans la division et le maintien de la forme bactérienne reste pour la plupart mystérieux. Découverte en 2005 au laboratoire comme muramidase potentielle, Pmp23 est la seule hydrolase membranaire du pneumocoque. En 2008, une étude avait montré que sa délétion entraîne des défauts morphologiques et la formation de septa mal positionnés et avortés, suggérant un rôle de cette protéine dans la localisation, l'assemblage ou l'activité des machineries de division et d'élongation. L'objectif de ce deuxième volet de ma thèse était donc d'élucider le rôle de Pmp23 dans la morphogénèse et la division du pneumocoque. Bien que l'approche biochimique de cette étude ait présenté un très grand nombre de difficultés, une combinaison d'approches génétique et de microscopie à fluorescence conventionnelle a permis de mettre en évidence un rôle important de Pmp23 dans la localisation des protéines de division et de synthèse du PG. Cette publication décrit l'ensemble de ces résultats, qui ont révélé une connexion inattendue entre le métabolisme du PG et la division cellulaire.

## Résultats

**Pmp23 possède une forte homologie avec les enzymes de type lysozyme bactérien. Pmp23 est capable de lier le PG mais n'a pas d'activité détectable *in vitro*.**

Pmp23 a été originellement identifiée comme étant une enzyme capable de couper les chaînes de sucre dans le PG, c'est-à-dire une muramidase (voir p. 52-53). Une recherche d'homologues structuraux de Pmp23 a permis d'identifier la protéine CwIT (identité de séquence d'~30%), une enzyme retrouvée dans de nombreuses bactéries à Gram positif et possédant une activité de type lysozyme (hydrolyse de la liaison  $\beta$ -1,4 entre le MurNac et le

GlcNac). Cette famille d'enzyme a été nommée "bLysG" pour "lysozyme bactérien de type goose(G)". Pmp23 présente une conservation stricte des résidus catalytiques identifiés dans cette famille protéique, et elle possède également le motif conservé DvmQsses, suggérant qu'elle soit elle-aussi un lysozyme bactérien. Afin de caractériser l'activité enzymatique de Pmp23 par une approche biochimique, nous avons tenté d'exprimer une forme recombinante de la protéine déletée de son segment transmembranaire chez *E. coli*. Cette construction ayant résulté en des corps d'inclusion, nous avons produit et solubilisé la forme membranaire complète de la protéine pour nos études *in vitro*. Bien que cette forme membranaire soit capable de se lier au PG, aucune activité de dégradation du PG n'a jamais pu être détectée en solution. De nombreuses conditions expérimentales ont pourtant été testées: incubation dans divers tampons, en présence de PG acétylé ou non acétylé, de PG issu d'une souche de pneumocoque déletée de Pmp23, de chaînes glycanes nues, incubation en présence d'autres hydrolases, ... Afin d'identifier de nouvelles pistes expérimentales, nous avons également modélisé la structure tridimensionnelle de Pmp23 en utilisant les structures de CwlT de *Clostridium difficile* et de *Staphylococcus aureus*. De manière intéressante, Pmp23 possède une insertion de 7 acides aminés (a.a. 150-156) qui formeraient une boucle qui pourrait entraver l'accessibilité au site actif et ainsi réguler l'activité de Pmp23. Nous avons produit un mutant déleté de cette boucle 150-156 et répété toutes les expériences d'hydrolyse du PG sans succès. Nous avons donc décidé de changer de stratégie et d'étudier le rôle de Pmp23 par des approches génétiques et de microscopie à fluorescence.

### **L'inactivation de Pmp23 cause des défauts morphologiques associés à une localisation aberrante de FtsZ et des PBPs.**

Afin d'obtenir plus d'informations sur la fonction de Pmp23 et son activité enzymatique, nous avons construit une souche de pneumocoque déletée de Pmp23 ou exprimant un mutant ponctuel de Pmp23 au niveau du résidu catalytique majeur (E61). En l'absence de la protéine ou en présence du mutant catalytique, les cellules de pneumocoque sont globalement plus longues et larges que la population sauvage. Par ailleurs, une partie de la population (13-16%) montre des défauts de forme encore plus prononcés, ainsi que des défauts de division.

La présence de cellules avec une morphologie altérée indique que la synthèse du PG ne se fait pas correctement. L'analyse de la composition du PG dans le mutant de déletion a montré que dans ce dernier, les dimères et les trimères peptidiques sont légèrement plus



abondants que dans la souche de pneumocoque sauvage. Pmp23 étant une hydrolase des chaînes de sucre, cette modification est donc certainement une conséquence indirecte de sa délétion, lié potentiellement à une activité transpeptidase ou endopeptidase portée par une autre protéine. Nous avons ensuite analysé la localisation de la synthèse du PG en utilisant des acides aminés fluorescents qui marquent les zones de synthèse active du PG. Dans les cellules présentant une morphologie relativement proche du type sauvage, cette expérience n'a pas montré de problème majeur dans la synthèse du PG, indiquant qu'en l'absence de Pmp23 ou en présence d'un mutant catalytique, la machinerie de synthèse du PG est toujours active. Seules les cellules présentant une morphologie très altérée ont montré des sites de synthèse aberrants, qui par ailleurs co-localisaient avec FtsZ. Il semblait donc que la synthèse du PG ne soit pas directement altérée mais que ce soit plutôt la localisation des protéines de la division et de la synthèse du PG qui soit affectée. Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons déterminé la localisation de FtsZ et de deux PBPs essentielles à la division et à l'élongation (PBP2x et PBP2b, respectivement) dans des souches sauvages et mutantes (délétion de Pmp23 ou mutant catalytique). Dans la majorité des cellules délétées de Pmp23 ou exprimant un mutant catalytique, FtsZ, PBP2x et PBP2b se localisent de manière identique aux cellules sauvages, et cela même lorsque les cellules mutantes sont visiblement plus longues et plus larges. En revanche dans les cellules ayant des défauts morphologiques importants, la protéine FtsZ montre des localisations aberrantes (localisation asymétrique par rapport au centre de la cellule, structures en forme d'hélices ou plan de division incorrect). De manière attendue puisque FtsZ recrute les protéines de synthèse du PG, la délocalisation de FtsZ est toujours associée à la délocalisation de PBP2x et de PBP2b. Ces défauts de localisation de FtsZ et des PBPs vont entraîner la synthèse du PG sur des sites aberrants et ainsi causer les défauts morphologiques observés.

### **L'activité de Pmp23 est nécessaire à la stabilité des structures cellulaires adoptées par MapZ**

De manière surprenante, alors que Pmp23 est une hydrolase agissant sur le PG, l'absence de celle-ci ou de son activité enzymatique déstabilise le positionnement de l'anneau formé par FtsZ, qui est une protéine cytoplasmique. Récemment, le positionnement de l'anneau Z chez *S. pneumoniae* a été montré comme étant dépendant de la protéine MapZ (voir p. 36-37). Cette protéine transmembranaire possède un domaine cytoplasmique qui interagit avec FtsZ et un domaine extracellulaire d'interaction avec le PG. Nous nous sommes demandé si la déstabilisation de l'anneau Z dans les souches mutantes de Pmp23 ne pourrait

pas être liée à une perturbation de la localisation de MapZ. Dans les souches de délétion de Pmp23 ou exprimant un variant inactif, la majorité des cellules montrent une localisation de MapZ similaire à celle observée dans les cellules sauvages. Cependant, dans les cellules ayant des dimensions élargies, nous avons observé une légère délocalisation de la protéine MapZ sur l'ensemble de la membrane. Dans les cellules avec de gros défauts morphologiques, MapZ forme diverses structures aberrantes, incluant des structures en forme de Y, des anneaux multiples, des structures agrégées, des positionnements asymétriques ou une localisation membranaire diffuse. L'inactivation de Pmp23 semble donc entraîner une instabilité de la structure de MapZ, ce qui engendre une instabilité du positionnement de l'anneau Z et de l'ensemble de la machinerie de synthèse du PG.

## Conclusion

Le positionnement et l'assemblage des protéines du cytosquelette et de synthèse du PG sont intimement liés à la forme de la bactérie. Alors que les hydrolases sont perçues comme étant des enzymes n'intervenant qu'après l'assemblage des machineries de synthèse du PG, nous avons montré que l'hydrolase Pmp23, et plus particulièrement son activité, joue un rôle important dans le positionnement et la localisation de l'anneau Z et de de la machinerie de synthèse du PG. A ce jour, la seule autre démonstration d'un rôle similaire joué par une hydrolase concerne la D,D carboxypeptidase DacA (PBP3), dont l'absence entraîne le découplage spatial de FtsZ et des PBPs. MapZ n'avait pas encore été découverte lorsque ces travaux ont été réalisés et il avait été proposé que DacA régule le positionnement des PBPs, pas celui des protéines localisées dans le cytoplasme. Dans notre étude, nous avons montré qu'une hydrolase peut, par son activité de modification du PG, réguler le positionnement de protéines cytoplasmiques telles que FtsZ. Ce mécanisme nécessite évidemment l'intervention d'une protéine qui possède une double topologie extra- et intracellulaire afin de connecter les évènements localisés dans le PG aux évènements localisés dans le cytoplasme. Nos données suggèrent que la protéine établissant ce lien est MapZ, révélant une nouvelle connexion entre le métabolisme de la paroi et la division cellulaire chez *S. pneumoniae*.

**Publication n° II :**  
**A new connection between cell wall metabolism and cell division**  
**in *S. pneumoniae***

# **A new connection between cell wall metabolism and cell division in *S. pneumoniae***

Maxime Jacq<sup>1,2,3</sup>, Christopher Arthaud<sup>1,2,3</sup>, Sylvie Manuse<sup>4</sup>, Christophe Grangeasse<sup>4</sup>, Katharina Peters<sup>5</sup>, Waldemar Vollmer<sup>5</sup>, Laure Bellard<sup>1,2,3</sup>, Yves V. Brun<sup>6</sup>, Michael S. VanNieuwenhze<sup>6</sup>, Anne-Marie Di Guilmi<sup>3,1,2</sup>, Thierry Vernet<sup>3,1,2</sup>, and Cecile Morlot<sup>2,1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France

<sup>2</sup> CNRS, IBS, F-38044 Grenoble, France

<sup>3</sup> CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France

<sup>4</sup> BMSSI, IBCP, Université Lyon 1, CNRS, UMR 5086, Lyon 69007, France

<sup>5</sup> Centre for Bacterial Cell Biology, Institute for Cell and Molecular Biosciences, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE2 4AX, UK

<sup>6</sup> Departments of Biology and Chemistry, Indiana University, Bloomington, Indiana 47405, USA

\*To whom correspondence should be addressed.

Dr. Cécile Morlot, Pneumococcus Group - IBS, 71 avenue des martyrs, CS 10090, 38044 Grenoble Cedex 9, France. Tel: +33 4 57 42 86 55, Fax: +33 4 76 50 18 90, email: [cecile.morlot@ibs.fr](mailto:cecile.morlot@ibs.fr)

**Running title:** Pmp23 is required for stability of the division ring

## **ABSTRACT**

Bacterial morphogenesis and division result from the spatio-temporal coordination (localization, assembly and activity) of macromolecular machineries in charge of cytokinesis and cell wall synthesis. The division machinery is scaffolded by the cytoskeleton protein FtsZ and it includes cytoplasmic and membrane proteins with enzymatic, regulatory or structural functions. These division proteins establish a complex network of transient functional and/or physical interactions to coordinate cytokinesis with cell wall synthesis, thus preserving cell shape and cell integrity. Cell wall hydrolases are major contributors to this coordination mechanism since their deletion or depletion often results in morphological and/or division

defects. However, the exact function of most of them remains mysterious. In this study, we have investigated the role of the putative cell wall hydrolase Pmp23 in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae* and this work unraveled a new regulatory function for cell wall hydrolases in cell division. Our data indicate that Pmp23 has likely a lysozyme activity required for *S. pneumoniae* morphogenesis and division. We show that the absence of Pmp23 or expression of an inactive variant results in partial mislocalization of the major division and cell wall synthesis proteins FtsZ, PBP2x and PBP2b. Our data further indicate that aberrant localization patterns of these division proteins do not arise from major cell wall synthesis defects but likely arise from partial mislocalization of MapZ, the FtsZ-positioning protein that was recently discovered in *S. pneumoniae*. This work uncovers a new function for cell wall hydrolases, which is to contribute to the stability of the division machinery through stabilization of MapZ cellular structures.

## INTRODUCTION

Bacterial division results from the combination of membrane constriction with expansion and remodeling of the cell wall. The main constituent of the cell wall is the peptidoglycan, an extremely resistant molecular mesh made of glycan chains cross-linked by peptide bridges (Vollmer et al., 2008a). Peptidoglycan expansion and remodeling requires two major classes of enzymes: the Penicillin-Binding Proteins (PBPs), which catalyze the polymerization of the glycan chains and the reticulation of the peptide chains (Sauvage et al., 2008), and the cell wall hydrolases (CWHs), which carry various cell wall degrading and remodeling activities (van Heijenoort, 2011; Vollmer et al., 2008a). The enzymatic activity of most CWHs is known but this is not sufficient to understand why they are important for bacterial morphogenesis and division. Known CWH functions include regulation of peptidoglycan precursor availability, peptidoglycan maturation, septum splitting, cell separation and autolysis. It has also been proposed that some CWHs partially degrade the existing peptidoglycan polymer to allow insertion of new material although direct evidence for such mechanism is still lacking. While the role of the CWHs involved in cell separation and autolysis has been rather well studied, little is known regarding the cellular function of the other ones.

To ensure proper cell division and cell integrity, cell wall synthesis and remodeling need to be coordinated with membrane constriction, led by the tubulin homologue FtsZ. This

coordination relies on a complex network of transient functional and physical interactions, yet to be fully identified and characterized, between PBPs, CWHs, FtsZ and other proteins with structural or regulatory functions. FtsZ, which polymerizes at midcell into a ring-like structure called the Z-ring (Meier et al., 2014), has a major role in this coordination mechanism since it recruits various division proteins, including some PBPs and CWHs, to the division site through direct or indirect interactions (Egan and Vollmer, 2013; Fleurie et al., 2014a; Massidda et al., 2013; Sham et al., 2011). In the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*, a few proteins were shown to have a regulatory function in division, including proteins involved in the regulation of the cell wall synthesis activity of the division machinery (StkP, GpsB, DivIA) (Fleurie et al., 2014a; Morlot et al., 2013) or more recently in the positioning, stability and constriction of the Z-ring at midcell (MapZ) (Fleurie et al., 2014b; Monahan et al., 2014). CWHs also have a regulatory function in division since impairment of their activity or localization leads to severe division defects (Ng et al., 2004; Pagliero et al., 2008; Potluri et al., 2012; Schuster et al., 1990). However, their precise regulatory function in the division process remains unclear. Investigating this question in model organisms like *E. coli* and *B. subtilis* is difficult because these bacteria possess a large number of CWHs (up to 35 CWHs) with redundant functions (van Heijenoort, 2011; Smith et al., 2000). By contrast, the ovococcus *S. pneumoniae* not only possesses a smaller number of CWHs (only 11 pneumococcal CWHs have been identified so far, Barendt et al., 2011), but they also appear to have unique functions since single deletions are sufficient to observe division defects (Ng et al., 2004; Pagliero et al., 2008; Schuster et al., 1990). Among the CWHs involved in pneumococcal division, the putative *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase/endopeptidase PcsB is required for septum splitting (Bartual et al., 2014; Ng et al., 2004), the D,D-carboxypeptidase PBP3 (DacA) and the L,D-carboxypeptidase DacB trim the pentapeptide substrates of the PBP synthases (Abdullah et al., 2014; Barendt et al., 2011; Hoyland et al., 2014; Morlot et al., 2004, 2005). Interestingly, a role for PBP3 in the localization of FtsZ and the PBPs was shown previously (Morlot et al., 2004). A fourth CWH, called Pmp23 (*spr0930* gene), is involved in *S. pneumoniae* cell division and morphogenesis. Pmp23 was originally discovered as a putative *N*-acetylmuramidase (lytic transglycosylase or lysozyme) in *S. pneumoniae* and its deletion was shown to result in enlarged cells and misplaced septa (Pagliero et al., 2005, 2008). However, its exact function in *S. pneumoniae* morphogenesis and division has remained mysterious so far. Pmp23 is particularly interesting because it is the only predicted membrane CWH in *S. pneumoniae* (Pagliero et al., 2005), thus displaying an ideal topology to interact with other morphogenetic and division proteins anchored in the

membrane. In addition, it carries a glycoside hydrolase domain that is conserved in many Gram-positive bacteria, including various human pathogens. In this work, we investigated the role of Pmp23 in the localization and the activity of *S. pneumoniae* division machinery. Using 3D homology modeling, peptidoglycan binding assays, fluorescence microscopy and protein-protein interaction experiments, our data suggest that Pmp23 is a bacterial lysozyme required for stability of the division machinery, unraveling a new connection between cell wall metabolism and cell division.

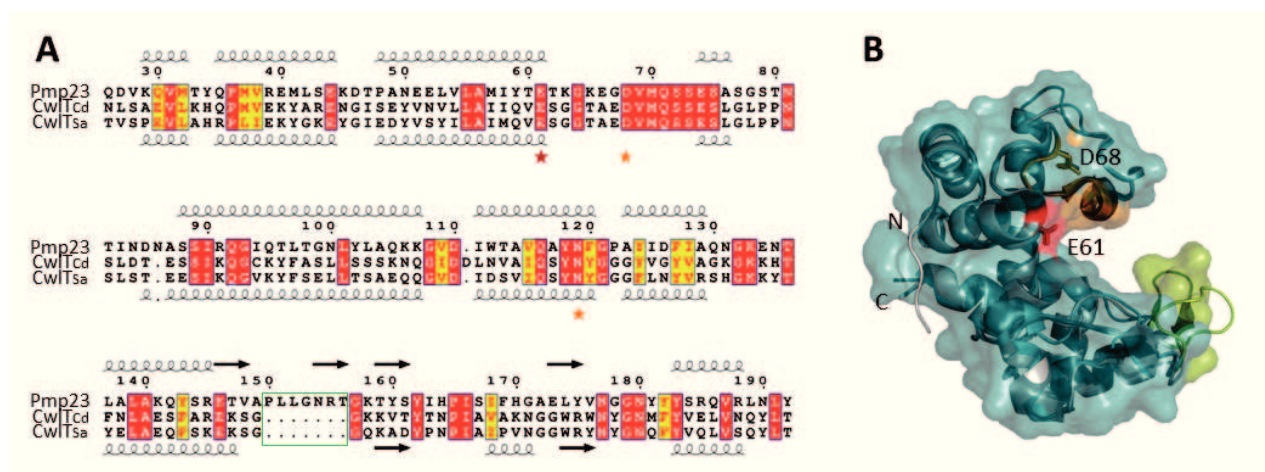
## RESULTS

### **Pmp23 has close homology with bacterial lysozymes**

In a previous work, bioinformatic analyses identified Pmp23 as a putative lytic transglycosylase (LT) or goose(G)-type lysozyme in *S. pneumoniae* (Pagliero et al., 2005). The low sequence identity of Pmp23 with LTs (16%, 15% and 10% with *E. coli* Slr70, MltE and the G-type lysozyme, respectively) prompted us to revisit this analysis. A search for structural homologues in the Protein Data Bank through the NCBI server (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) identified the bacterial lysozyme domains (bLysG) of CwlT from *Clostridium difficile* (CwlT<sub>Cd</sub>) and *Staphylococcus aureus* (CwlT<sub>Sa</sub>), which display 32% and 29% identity with Pmp23, respectively (Fig. 1A). We then performed 3D homology modeling through the Swiss Model server (<http://swissmodel.expasy.org/>; Bordoli et al., 2009; Kelley et al., 2015), using the bLysG domain of CwlT<sub>Cd</sub> (PDB code 4HPE) and CwlT<sub>Sa</sub> (PDB code 4FDY) as templates (Xu et al., 2014). As expected, the overall architecture of the resulting Pmp23<sub>4HPE</sub> and Pmp23<sub>4FDY</sub> models is similar to that of the bLysG domains (Fig. 1B and S1). They contain most exclusively  $\alpha$ -helices that form two N- and C-terminal lobes delimiting the active site groove, which traverses one face of the protein (Fig. S1). Within the active site, the catalytic Glu and Asp residues of CwlT (E81 and D88 in CwlT<sub>Cd</sub>, E83 and D90 in CwlT<sub>Sa</sub>) are conserved in Pmp23 and correspond to positions E61 and D68 (Fig. 1). In addition, the DVMQSSSES sequence motif characteristic of the bLysG domains (Xu et al., 2014) is strictly conserved in Pmp23 (residues 68-75, Fig. 1). Altogether, these observations strongly suggest that Pmp23, like the bLysG domain of CwlT proteins, carries a bacterial lysozyme activity, which uses water to cleave the glycosidic bond between MurNAc and GlcNAc (Fukushima et al., 2008; Xu et al., 2014).

Interestingly, alignment of Pmp23 with CwlT proteins shows the presence of a 7-amino acid insertion (residues 150-156) in Pmp23 (Fig. 1 and S1). Homology modeling of Pmp23

suggests that this insertion region, which is located in the C-terminal lobe, might hamper the accessibility to the active site groove on one end of the molecule (Fig. S1), suggesting a potential role for this region in the regulation of Pmp23 activity. To test this idea, some of the enzymatic assays described below were performed with a variant of Pmp23 deleted for this insertion region (Pmp23( $\Delta$ 150-156)).



**Figure 1. Pmp23 shows homology with bacterial lysozymes.** **A.** The sequence of Pmp23 from *S. pneumoniae* R6, CwlT from *C. difficile* 630 (CwlT<sub>Cd</sub>) and *S. aureus* Mu50 (CwlT<sub>Sa</sub>) were aligned using ClustalW (Combet, C., C. Blanchet, C. Geourjon, and G. Deléage. “NPS@: Network Protein Sequence Analysis.” *Trends in Biochemical Sciences* 25, no. 3 (March 2000): 147–50). The resulting alignment figure was generated with ESPrnt. Conserved residues are in red boxes, similar residues in red characters. The secondary structures of CwlT<sub>Sa</sub> (PDB code 4FDY) and the predicted ones for Pmp23 are indicated below and above the sequence alignment, respectively. Residue numbering is for Pmp23. The catalytic glutamate is highlighted with a red star and the other residues required for CwlT activity are highlighted with a blue star. **B.** Ribbon representation of the Pmp23 models (Pmp23<sub>4FDY</sub> in deep teal, Pmp23<sub>4HPE</sub> in cyan) superposed onto CwlT<sub>Cd</sub> (PDB code 4HPE, in grey). The surface of Pmp23<sub>4FDY</sub> is shown and the N- and C-termini are labeled. The insertion region that partially hampers access to the active site is in chartreuse (for Pmp23<sub>4FDY</sub>) and in green (for Pmp23<sub>4HPE</sub>). The E61 and D68 residues are labeled and shown in red and orange stick, respectively. The D<sub>68</sub>VMQSSE motif is colored orange.

### **Pmp23 is able to bind peptidoglycan but has no detectable enzymatic activity in solution**

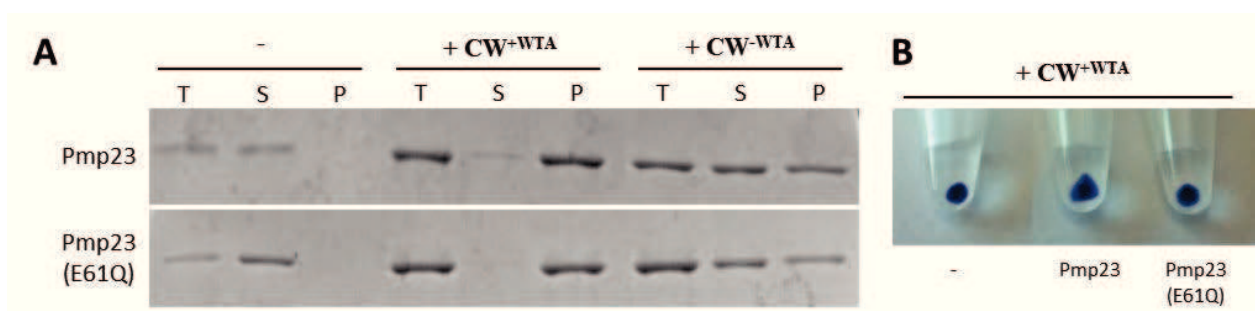
To get further insights into the function of Pmp23, we sought to determine its enzymatic activity. Full-length Pmp23 fused to the Glutathione S-Transferase affinity tag (GST-Pmp23) was purified and solubilized with the non-ionic detergent DDM, and incubated overnight at 37°C in the presence of unlabeled or RBB-labeled sacculi (see *Materials and Methods* section). The soluble fraction, which contained potential peptidoglycan degradation products and/or free protein, was then separated from the insoluble intact sacculi by centrifugation.



Pmp23 was almost exclusively detected in the sacculi pellet, which seemed looser in the presence of the protein (Fig. 2). By contrast, when Pmp23 was incubated in the absence of sacculi (Fig. 2A), more than 98% of the protein was recovered in the centrifugation supernatant. In addition, the GST tag alone did not bind sacculi and after centrifugation, the sacculi pellet had a tight and dense appearance (data not shown). Although Pmp23 is able to bind sacculi, no degradation product could ever be detected on various preparations of sacculi, including treatment for removal of teichoic acids, amidase digestion for removal of peptide chains, and chemical *N*-acetylation (see *Materials and Methods* section). Notably when wall teichoic acids were removed, 50% of Pmp23 was still retrieved in the pellet fraction (Fig. 2A), indicating that WTA are not required for Pmp23 binding, but might stabilize its interaction with sacculi. Alternatively, TCA treatment might have modified the peptidoglycan structure in a way that reduces Pmp23 affinity. The peptidoglycan degradation assays were also unsuccessful when the Pmp23( $\Delta$ 150-156) variant, which lacks the insertion region that partially restrains access to the active site, was used.

In order to test whether the change in the sacculi texture in the presence of Pmp23 was due to a potential enzymatic activity of the protein, we incubated the sacculi in the presence of a variant carrying a Gln substitution in place of the putative catalytic Glu (Pmp23(E61Q)). Pmp23(E61Q) bound the sacculi in the same proportion than the native protein (Fig. 2A) and the sacculi pellet had the same loose texture, indicating that this alteration is not likely due to Pmp23 enzymatic activity.

Altogether, these data indicate that Pmp23 is able to bind sacculi but has no detectable cell wall degrading activity *in vitro*.



**Figure 2. Interaction of Pmp23 with the cell wall.** A. GST-Pmp23 or GST-Pmp23(E61Q) was incubated at 37°C for 10 min in the absence (-) or in the presence of RBB-labeled sacculi containing (+ CW<sup>+WTA</sup>) or deprived of (+ CW<sup>-WTA</sup>) of wall teichoic acids. The protein fraction bound to the cell wall was separated from the unbound fraction by centrifugation. For each experiment, the total (T) amount of loaded protein, the centrifugation supernatant (S) and pellet (P) fractions were analyzed on a 12.5% SDS-PAGE stained with Coomassie brilliant blue. Images are representative of experiments made in triplicate. B. Images show the tight

and dense texture of the cell wall pellet containing wall teichoic acids (+ CW<sup>WT<sub>A</sub></sup>), in the absence of protein (-) and the looser pellet texture in the presence of GST-Pmp23 or GST-Pmp23(E61Q).

### **Inactivation of Pmp23 causes morphological defects in *Streptococcus pneumoniae* R6**

Deletion of the *pmp23* gene was previously shown to affect cell morphogenesis and division in *S. pneumoniae* (Barendt et al., 2011; Pagliero et al., 2008). These deletion mutants were made by disrupting the *pmp23* gene of *S. pneumoniae* R6 or D39 with an antibiotic insertion cassette. To verify that the phenotypes of these strains were not due to a polar effect on the expression of neighboring genes, we constructed two markerless mutant strains of *S. pneumoniae* R6 (see *Materials and Methods* section), one deleted for the *pmp23* gene ( $\Delta pmp23$ ) and the other one expressing a Pmp23 variant carrying the E61Q mutation (*pmp23(E61Q)*). In the absence of Pmp23, most cells were longer and larger than in the wild-type strain (Fig. S2). Mean values of  $1.94 \pm 0.5 \mu\text{m}$  and  $1.73 \pm 0.3 \mu\text{m}$  were obtained for the cell length of  $\Delta pmp23$  and wild-type cells (n=644 and n=371), respectively. Mean values of  $0.84 \pm 0.06 \mu\text{m}$  and  $0.74 \pm 0.05 \mu\text{m}$  were obtained for the cell width of  $\Delta pmp23$  and wild-type cells, respectively. In addition, ~13% of cells had a distorted shape, indicative of division defects. Finally, a slight chaining phenotype was observed, suggesting that cell separation is partially impaired in the absence of Pmp23. The morphology of the *pmp23(E61Q)* mutant strain is similar to  $\Delta pmp23$  strain, cells being longer (mean length of  $1.85 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ) and larger (mean length of  $0.81 \pm 0.06 \mu\text{m}$ ) than wild-type, and 16% of cells showing division defects (n=742) (Fig. S2). In addition, both the  $\Delta pmp23$  and *pmp23(E61Q)* strains showed an increased sensitivity towards PenG when compared to the wild-type strain (data not shown), suggesting that the composition of the cell wall is altered in the absence of Pmp23 or in the presence of an inactive variant. The overall phenotype of the  $\Delta pmp23$  strain indicates that Pmp23 is involved in pneumococcal division and maintenance of cell shape. In addition, the fact that the E61Q mutation phenocopies the deletion of *pmp23* further supports the idea that Pmp23 is an active cell wall degrading enzyme.

To determine whether inactivation of Pmp23 might alter the composition of the peptidoglycan, we purified sacculi from wild-type and  $\Delta pmp23$  cells, and we analyzed them by LC/MS (see *Materials and Methods* section). The glycan strands in pneumococcal peptidoglycan are very long, most of them containing more than 25 disaccharides (Wheeler et al., 2011). The purified sacculi thus had to be treated with mutanolysin before LC/MS analysis. Therefore, the length of the glycan strands in wild-type versus  $\Delta pmp23$  cells could not be determined using this strategy. On the other hand, we detected a slight increase (~50%

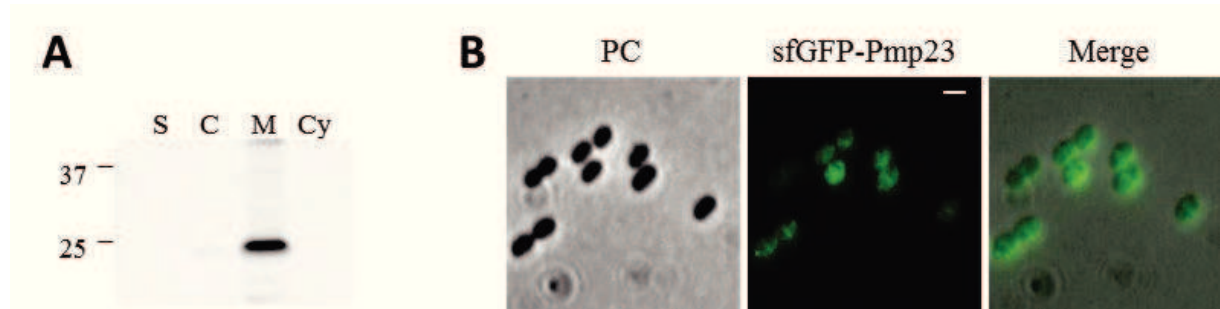
in wild-type cells versus ~54% in *Δpmp23* cells) of cross-linked materials (dimers and trimers) in the absence of Pmp23 (Table S1). This observation is an indirect consequence of the *pmp23* deletion since Pmp23 does not have any endopeptidase domain.

### **Pmp23 is a membrane protein localizing at midcell and interacting with the pneumococcal division machinery**

Depending on the bioinformatic algorithm used TMHMM (Krogh et al., 2001) or Phobius (Käll et al., 2007), the first 23 amino acids of Pmp23 are predicted to encode a transmembrane helix or a signal sequence for secretion. Subcellular fractionation of *S. pneumoniae* R6 cells expressing an ectopic copy of Pmp23 fused to a triple FLAG epitope (*3xflag-pmp23*) was therefore performed to experimentally determine whether Pmp23 is anchored in the pneumococcal membrane or is a secreted protein. Using anti-FLAG antibodies, 3xFLAG-Pmp23 was almost exclusively detected in the membrane fraction (Fig. 3A). It was absent from the concentrated culture medium and present in a very minor proportion in the cell wall fraction (<2% of the total expressed proteins). We thus conclude that Pmp23 is localized in the membrane of *S. pneumoniae*. Besides, fluorescence microscopy imaging of *S. pneumoniae* R6 cells expressing an ectopic sfGFP-Pmp23 fusion protein revealed that Pmp23 localizes at midcell (Fig. 3B), which is the unique site of cell wall synthesis where most of the pneumococcal division proteins are positioned.

The bitopic topology of Pmp23, which possesses a transmembrane segment and an extracellular domain, as well as its septal localization, puts this CWH in a unique position to physically and functionally interact with the division machinery. To identify potential partners of Pmp23, we performed immunoprecipitation experiments on detergent-solubilized membrane fractions from pneumococcal cells expressing the 3xFLAG-Pmp23 fusion protein. 3xFLAG-Pmp23 was immunoprecipitated using anti-FLAG agarose resin as described in the *Materials and Methods* section. In addition to 3xFLAG-Pmp23, PBP2x was detected in the immunoprecipitated fraction, indicating that the two proteins belong to the same complex in the membranes of *S. pneumoniae* (Fig. S3A). Importantly, PBP2x was not found in the immunoprecipitate from an extract derived from a strain that did not express FLAG<sub>3</sub>-Pmp23 (Fig. S3A). To determine whether Pmp23 and PBP2x interact directly and to quantify this interaction, microscale thermophoresis (Jerabek-Willemsen et al., 2011) was carried out by titrating the binding of the extracellular domain of PBP2x (Morlot et al., 2013) to the full-length Pmp23 (see *Material and Methods* section). Labeled Pmp23 was supplemented with increasing concentrations of PBP2x and BSA (Bovine Serum Albumine) was used as a

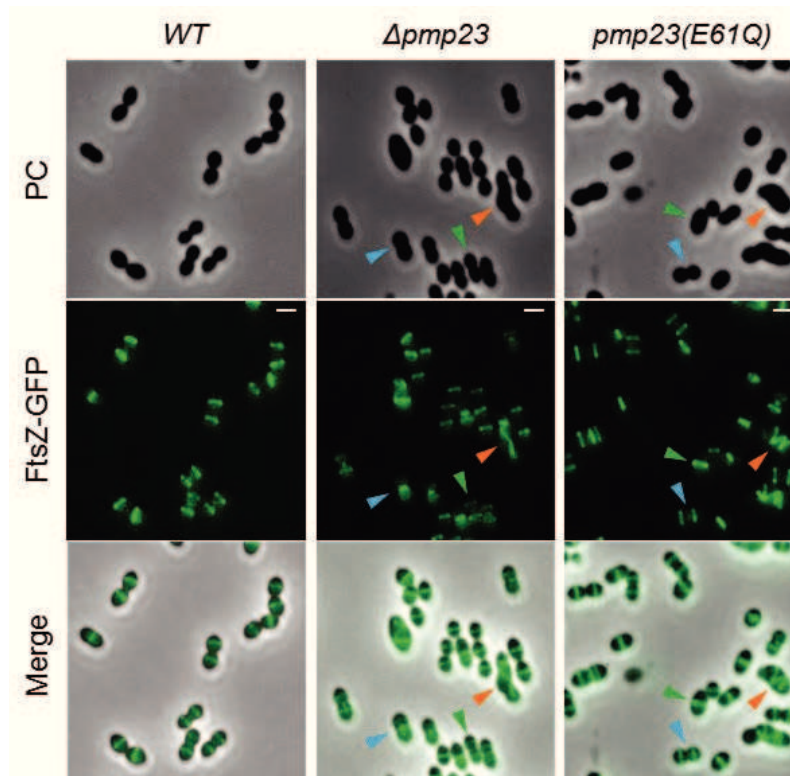
negative control. While no binding of Pmp23 could be detected with the BSA, an affinity constant of  $7 \pm 0.8 \mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) was obtained for the Pmp23-PBP2x complex (Fig S3B). This result indicates that Pmp23 and PBP2x interact directly through their extracellular domain.



**Figure 3. Localization of GFP-Pmp23 in *S.pneumoniae*.** **A.** Cell fractionation of *S. pneumoniae* cells expressing an ectopic copy of 3xFlag-Pmp23. Samples of the culture supernatant (S), cell wall (C), membrane (M) and cytoplasmic (Cy) fractions were analyzed by 12.5% SDS-PAGE. The presence of 3xFlag-Pmp23 was revealed by western blot using anti-FLAG antibodies. **B.** Phase contrast (PC) and fluorescence microscopy images of live *S. pneumoniae* cells expressing an ectopic copy of Pmp23 fused to the superfolder GFP (sfGFP-Pmp23). The merge pictures show the overlay of sfGFP-Pmp23 and phase contrast images. Scale bars = 1  $\mu\text{m}$ .

### Inactivation of Pmp23 leads to aberrant localization of the division machinery

The morphological and division defects observed with the  $\Delta pmp23$  and  $pmp23(E61Q)$  mutant strains suggest that the localization or activity of the division machinery is impaired when Pmp23 is absent or inactive. To test this idea, we first investigated the localization of the major division protein FtsZ and the cell wall synthases PBP2x and PBP2b in wild-type,  $\Delta pmp23$  and  $pmp23(E61Q)$  strains. To do so, we expressed previously described FtsZ-GFP, GFP-PBP2x and GFP-PBP2b fusions at their endogenous locus, under the control of the native promoters (Fleurie et al., 2014a). Most  $\Delta pmp23$  and  $pmp23(E61Q)$  cells (88%,  $n = 310$  and 85%,  $n = 232$ , respectively), including those with slightly enlarged dimensions, displayed the previously described localization of FtsZ, PBP2x and PBP2b, with midcell positioning of ring-like structures, progressive constriction and relocalization at the future division sites (Fleurie et al., 2014a; Morlot et al., 2003, 2013) (Fig. 4, S4 and S5). However in both strains, all cells with major morphological defects (12% of  $\Delta pmp23$  cells,  $n = 310$ ; 15% of  $pmp23(E61Q)$  cells,  $n = 232$ ) showed aberrant FtsZ, PBP2x and PBP2b localizations, including annular structures that failed to position at midcell and helix-like structures (Fig. 4, S4 and S5). Aberrant structures of FtsZ always colocalized with PBP2x and PBP2b (Fig. S4 and S5). Altogether, these observations suggest that in the absence of Pmp23 or in the presence of an inactive variant, the division and cell wall synthesis machinery is still able to assemble at midcell, but sometimes degenerates into aberrant structures.



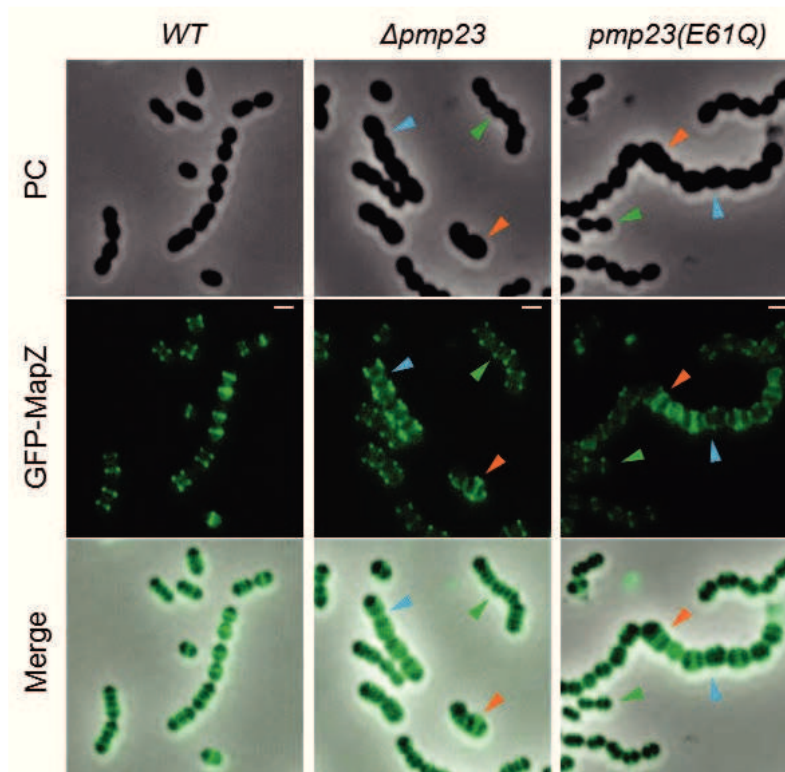
**Figure 4. FtsZ localization in the presence of Pmp23 or when Pmp23 is inactivated.** Live *S. pneumoniae* cells expressing an endogenous copy of FtsZ-GFP in wild-type (*WT*),  $\Delta pmp23$  and *pmp23(E61Q)* genetic backgrounds. Phase contrast (PC), GFP fluorescence and merged images are shown. Scale bars = 1  $\mu$ m.

### The cell wall synthesis machinery is still active when Pmp23 is inactivated

We next wondered whether the aberrant FtsZ, PBP2x and PBP2b structures observed in the  $\Delta pmp23$  and *pmp23(E61Q)* cells might arise from altered cell wall synthesis. To test this idea, we monitored cell wall synthesis activity by pulse-chase labeling of new peptidoglycan using fluorescent D-amino acids (FDAAs, Kuru et al., 2015). Wild-type,  $\Delta pmp23$  and *pmp23(E61Q)* cells were grown shortly in the presence of the BADA label (Pilhofer et al., 2013), then the excess dye was washed away and cells were further incubated for 4 min. Most mutant cells (79%, n = 196 for  $\Delta pmp23$ ; 74%, n = 125 for *pmp23(E61Q)*) displayed a wild-type peptidoglycan labeling, which appeared as a single or double ring flanking the Z-ring depending on the advancement of the cell cycle (Fig. S6). In  $\Delta pmp23$  and *pmp23(E61Q)* cells displaying major morphological defects (21%, n = 196; 26%, n = 125, respectively), BADA labeling was still homogeneous although it displayed aberrant profiles that colocalized or flanked mislocalized FtsZ structures, indicating that the cell wall synthesis machinery is still active in the absence of Pmp23 or in the presence of an inactive enzyme, even when the division machinery fails to localize properly (Fig. S6).

### **MapZ localization is altered when Pmp23 is inactivated**

Because the activity of the cell wall synthesis machinery does not seem to be grossly impaired when Pmp23 is inactive, we hypothesized that aberrant division protein structures that are observed might arise from instability of the Z-ring. Recently, it was shown that the pneumococcal protein MapZ is involved in FtsZ positioning, stability and constriction. To investigate whether the localization of MapZ is altered when Pmp23 is inactivated, we expressed a previously described MapZ-GFP fusion in  $\Delta pmp23$  and  $pmp23(E61Q)$  cells (Fleurie et al., 2014b). Wild-type cells displayed the previously described MapZ localization pattern: assembly of a single septal ring at the onset of the cell cycle, splitting of this initial ring and progressive separation of the double ring, appearance and constriction of a third ring at midcell (Fleurie et al., 2014b) (Fig. 5 and S7). While  $\Delta pmp23$  and  $pmp23(E61Q)$  cells with wild-type morphology and dimensions displayed typical MapZ localization profiles, 14% (n = 370) of  $\Delta pmp23$  cells and 17% (n = 361) of  $pmp23(E61Q)$  cells displayed a slight diffuse membrane localization of MapZ, always associated with enlarged cell dimensions (Fig. 5 and S7). In addition, all the  $\Delta pmp23$  and  $pmp23(E61Q)$  cells with major morphological defects (13% of  $\Delta pmp23$  cells, n = 370; 15% of  $pmp23(E61Q)$  cells, n = 361) showed aberrant MapZ structures, including y-shaped, multiple (>3 rings), aggregated structures, diffuse membrane localization or asymmetric positioning of MapZ rings relative to the division site (Fig. 5 and S7). We thus conclude that Pmp23 is not required for the assembly of the MapZ rings but Pmp23 inactivation leads to partial mislocalization and instability of the MapZ structures and consequently, instability of the whole division machinery.



**Figure 5. MapZ localization in the presence of Pmp23 or when Pmp23 is inactivated.** Live *S. pneumoniae* cells expressing an endogenous copy of GFP-MapZ in wild-type (*WT*),  $\Delta pmp23$  and *pmp23(E61Q)* genetic backgrounds. Phase contrast (PC), GFP fluorescence and merged images are shown. Scale bars = 1  $\mu$ m.

## DISCUSSION

### Pmp23 is likely a bacterial lysozyme

Pmp23 was identified about 10 years ago as a member of the glycoside hydrolase family 23 (GH23), which includes lytic transglycosylases (LTs) and G-type lysozymes (Lombard et al., 2014; Pagliero et al., 2005). Lysozymes and LTs are both sugar hydrolases that cleave the  $\beta$ -1,4 MurNAc-GlcNAc glycosidic bond (*N*-acetylmuramidase activity), but LTs use the C-6 hydroxyl of MurNAc instead of water as a nucleophile in the cleavage reaction, generating a product ending with 1,6-anhydro MurNAc. The enzymatic activity of G-type lysozymes and LTs all require a conserved glutamate (E61 in Pmp23), but near this catalytic position, G-type lysozymes carry an asparagine and a second negatively charged residue (N119 and E74 in Pmp23) that are not conserved in LTs. Finally, the recently solved structure of two bacterial lysozyme domains, the bLysG domains of CwlT from *S. aureus* and *C. difficile*, revealed that these enzymes carry a conserved sequence motif DvmQsses (D<sub>68</sub>vmQsses in Pmp23, residues in upper and lower case being strictly and highly conserved, respectively), which is essential for bacterial lysozyme activity and defines the bLysG family (Fukushima et al., 2008; Xu et

al., 2014). Although we did not manage to characterize the enzymatic activity of Pmp23 *in vitro*, the presence of all the bLysG-specific residues, including the DvmQsses motif, strongly suggests that Pmp23 carries a bacterial lysozyme activity. Further evidence for such activity is provided by the fact that mutation of the putative catalytic glutamate E61 phenocopies the deletion of the whole protein in terms of cell morphology.

### **Pmp23 is involved in cell wall synthesis**

We demonstrated that Pmp23 is a membrane protein displaying the typical localization of pneumococcal division proteins, with initial midcell positioning as a ring-like structure and progressive constriction throughout the cell cycle. Pmp23 is thus ideally located to interact physically and/or functionally with division or cell wall synthesis proteins. In parallel, we detected an increase in the degree of peptidoglycan cross-linkage in the absence of Pmp23. Because Pmp23 has no endopeptidase domain, this observation suggests that either the protein activates a yet-to-be identified cell wall endopeptidase, or that Pmp23 interacts with a cross-linking enzyme. In agreement with this idea, we showed that Pmp23 and the peptidoglycan transpeptidase PBP2x form a complex in the membranes of *S. pneumoniae* and that the two proteins interact directly through their extracellular domains. Altogether, these observations suggest the two following hypotheses: 1) Pmp23 might restrain PBP2x activity, or 2) Pmp23 might degrade glycan strands improperly cross-linked by PBP2x, like strands that would carry an excessive degree of cross-linkage, or glycan strands that would cross over the midcell line. Unfortunately, we could not detect any effect of Pmp23 on PBP2x activity (data not shown) using an *in vitro* peptidoglycan synthesis assay (Zapun et al., 2013) and reversely, no cell wall degradation products could be detected when Pmp23 was incubated with purified sacculi in the presence of PBP2x. Although the purpose of the PBP2x-Pmp23 interaction remains to be discovered, it constitutes an additional interesting observation linking Pmp23 to pneumococcal division and cell wall synthesis.

### **Pmp23 activity is required for the localization and stability of MapZ structures**

To get further insights into Pmp23 cellular function, we analyzed the consequences of its deletion and inactivation on the localization of major division proteins and on cell wall synthesis activity. We studied the localization of the FtsZ ring (Z-ring), which is required for membrane constriction and septal recruitment of most of the division proteins (Erickson et al., 2010), as well as the localization of two essential PBPs for cell wall synthesis, PBP2x and PBP2b (Berg et al., 2013; Philippe et al., 2015). In  $\Delta pmp23$  and *pmp23(E61Q)* cells with



wild-type or slightly enlarged morphology, FtsZ displayed a wild-type localization pattern. On the other hand, cells with severe morphological defects all displayed aberrant FtsZ localizations, including Z-rings assembled at asymmetric positions or on incorrect division plans and helix-like structures. As expected, because the Z-ring serves as a scaffolding platform for the cell wall synthesis machinery, PBP2x and PBP2b co-localized with FtsZ in all cells, including those with major FtsZ localization defects. These observations indicate that in the absence of Pmp23 or in the presence of an inactive variant, the division and cell wall synthesis machinery is still able to assemble at midcell and constrict throughout the cell cycle. However, the aberrant localization of the division machinery in cells displaying important morphological defects indicates that the division process is somehow defective when Pmp23 is inactive. By monitoring cell wall synthesis in these cells, we showed that it remains active even though the division machinery is mislocalized. We thus reasoned that if mislocalization of the division ring does not arise from major cell wall synthesis defects, it might be due to instability of its macromolecular structure.

Recently, MapZ, a new substrate of the Ser/Thr kinase StkP, was shown to locate at the division site before FtsZ and serve as a beacon of FtsZ positioning at midcell (Fleurie et al., 2014b). In the absence of MapZ, ~30% of cells display aberrant FtsZ structures similar to those observed in the absence of Pmp23. Imaging of MapZ in the absence of Pmp23 or in the presence of an inactive variant revealed that all morphological changes were associated with a slight diffuse membrane localization of MapZ and cells with major morphological defects all displayed aberrant MapZ structures. From these observations, we conclude that Pmp23 is required for proper assembly of MapZ at midcell and for the stability of MapZ structures along the cell cycle. In addition, the fact that MapZ displays similar localization defects in *Δpmp23* and *pmp23(E61Q)* cells indicates that the role of Pmp23 in MapZ localization is rather enzymatic than structural. Altogether, our data are consistent with a first model in which Pmp23 would perform subtle peptidoglycan maturation that would be important for the localization and stability of MapZ macromolecular structures. In a second model, Pmp23 would have a “control quality” function aiming at correcting errors performed by the PBPs. In this model, the presence of glycan strands improperly incorporated into the existing peptidoglycan (incorrect orientation, excessive cross-linking or chains that would traverse the septum mediane) would lead to partial delocalization of MapZ unless being degraded by Pmp23. Importantly, this second model is consistent with the peptidoglycan modifications observed in the absence of Pmp23 and with the delocalization of MapZ that was previously observed upon inhibition of peptidoglycan synthesis (Fleurie et al., 2014b). In both models,

the absence of Pmp23 activity would induce partial mislocalization of MapZ, subsequently leading to the delocalization of FtsZ and the PBPs. Subtle mislocalization of these division proteins would first result in slight morphological defects (slight cell enlargement) that would rapidly be emphasized by the fact that cell wall synthesis continues even when the machineries are mislocalized, ultimately leading to severe morphological defects.

## **Conclusion**

Many studies support the idea that early division proteins drive the localization and assembly of the cell wall synthesis machinery, which includes CWHs. About 10 years ago, the CWH PBP3 (DacA), which carries a D,D-carboxypeptidase activity, was shown to be required for proper orientation of FtsZ and PBP annular structures at midcell (Morlot et al., 2004). This work seeded the idea that CWHs are important for proper assembly and localization of the cell wall synthesis machinery. In this work, we show that a CWH activity, localized extracellularly, is important for the stability the Z-ring, which is localized in the cytoplasm. Our data indicate that the connection between these extracellular and the intracellular events involves MapZ, a bitopic protein that guides FtsZ positioning at midcell. This work thus unravels a new cross-talk between cell wall metabolism and cell division. More generally, it suggests that although most of them are not essential for bacterial survival in laboratory conditions, CWH are certainly important safeguards insuring that bacterial division proceeds properly, providing optimal fitness in the ecological niche of the bacteria.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Bacterial strains and plasmids**

Strains, plasmids and oligonucleotides used in this study are listed in Tables S2 and S3. Plasmid construction and mutagenesis are described in Table S2.

### **Growth conditions, media and allelic replacement**

*S. pneumoniae* strains were grown at 37 °C in CY medium (Lacks and Hotchkiss, 1960) or in Todd Hewitt medium (TH, BD Sciences). Blood agar plates were made from Columbia agar containing 5% defibrinated horse blood (Difco) and the appropriate antibiotics (tetracycline, 2.5 µg · ml<sup>-1</sup>; kanamycin, 250 µg · ml<sup>-1</sup>; or streptomycin, 200 µg · ml<sup>-1</sup>). Markerless allelic replacements were performed using the Janus method as described previously (Fleurie et al., 2012). Briefly, we used a two-step procedure based on a bicistronic *kan-rpsL* cassette called

Janus (Sung et al., 2001) to delete the genes of interest, replace them by fluorescent protein fusion or introduce point mutations.

### **3D homology modeling of Pmp23**

The Swiss Model server (Bordoli et al., 2009) was used to generate models of the soluble domain of Pmp23 based on the structures of CwlT from *C. difficile* and *S. aureus* (PDB codes 4HPE and 4FDY, respectively; Xu et al., 2014). Both models display high confidence factors (~70%) and global QMEAN scoring functions (Benkert et al., 2011) of about -4.5.

### **Protein purification**

Two-liter cultures of *E. coli* BL21/DE3 cells transformed with the pMJ18 plasmid (*pGex4T1:gst-pmp23*) were grown in Terrific Broth (BD Biosciences) at 37°C until OD<sub>600nm</sub> of 0.8. Protein production was induced with 0.5 mM IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) and cultures were further grown overnight at 16°C. Cells were harvested by centrifugation and resuspended in 1/25<sup>th</sup> volume of buffer A (100 mM Mes pH6.0, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT,) containing the Complete<sup>TM</sup> cocktail of protease inhibitor (Roche). Cell lysis was carried out using a Microfluidizer® M110-P (Microfluidics) at 10,000 psi and cell debris were pelleted by centrifugation at 40,000 g for 30 min at 4°C. The centrifugation supernatant was then ultracentrifuged at 250,000 g for 1 hour at 4°C. The membrane pellet was resuspended in 20 mL of buffer B (50 mM Mes pH6.0, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 10 mM DDM) and incubated overnight at 4°C on a rotating wheel. After ultracentrifugation (250,000 g, 1h, 4°C), the supernatant containing the solubilized membrane protein was loaded on a Glutathione Sepharose affinity resin (GE Healthcare). After extensive wash, the protein was eluted with in buffer C (50 mM Mes pH6.0, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.5 mM DDM, 10 mM reduced glutathione).

The GST-PPBP2x recombinant construct was produced and purified as previously described (Morlot et al., 2013). Briefly, purification was performed in a Tris buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl) using a Glutathione Sepharose affinity resin. After load and extensive wash, the resin was incubated with thrombin for 1 h at room temperature to cleave the GST and release PBP2x in the flow-through. Flow-through fractions were concentrated with Amicon Ultra centrifugation filter units (molecular weight cut-off of 30,000; Millipore) and injected onto a 10/300 GL Superdex 200 gel filtration column (GE Healthcare). Proteins were eluted in a buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, and were concentrated

again with Amicon Ultra centrifugation filter units. Protein concentrations were measured using absorbance at 280 nm. Microscale thermophoresis analyses were performed as described previously (Morlot et al., 2013).

### **Preparation of *S. pneumoniae* sacculi**

Sacculi were prepared from *S. pneumoniae* R6 cells as described previously (Morlot et al., 2013). Briefly, 2 L of culture in TH were harvested when OD<sub>600</sub> reached 0.4 and resuspended in 40 mL of ice-cooled 50 mM Tris-HCl at pH 7.0. The cell suspension was poured dropwise into 150 mL of boiling 5% sodium dodecyl sulphate (SDS) solution and boiled for another 30 min. Sacculi were then harvested by centrifugation at room temperature and washed five times with water to remove SDS. Sacculi were treated with DNaseI (10 µg · ml<sup>-1</sup>) and RNaseI (50 µg · ml<sup>-1</sup>) for 2h at 37°C in PBS supplemented with 20mM MgSO<sub>4</sub>. This step was followed by addition of 10 mM CaCl<sub>2</sub> and 100 µg · ml<sup>-1</sup> trypsin, and overnight incubation at 37°C. The sacculi were boiled again in 1% SDS for 15 min, harvested by centrifugation at room temperature and washed several time with water before storage in water at 4°C. Sacculi were incubated with 20 mM Remazol Brilliant Blue (RBB, Sigma-Aldrich) in 250 mM NaOH overnight at 37°C, followed by neutralization with HCl. The RBB-labeled sacculi were pelleted by centrifugation (21,000 g, 20 min, room temperature) and washed with water until the supernatant was clear. The final pellet was resuspended in 1 mL of water and stored at 4°C. Further chemical modifications were either performed on RBB-labeled or unlabeled sacculi. Teichoic acid removal was performed by incubating the purified sacculi with 10% w/v aqueous trichloroacetic acid (TCA) overnight at 4°C. The peptidoglycan fraction was pelleted by centrifugation, washed and resuspended in water. Chemical peptidoglycan *N*-acetylation was performed by addition of 0.25 volumes of 5% acetic anhydride and 0.25 volumes of saturated NaHCO<sub>3</sub> incubated on ice for 30 min followed by 1 h at room temperature as described by Vollmer and Tomasz (Vollmer and Tomasz, 2000). The peptidoglycan was washed and resuspended in water.

### **Cell wall pull-down and digestion assays**

For cell wall pull-down assays, 5 µM GST-Pmp23 or GST-Pmp23(E61Q) were incubated at 37°C for 10 min in the presence (5 µL) or in the absence of RBB-labeled sacculi in 100 µL buffer C. The bound and unbound protein fractions were separated by centrifugation at 21,000 g for 10 min. The supernatant, containing the unbound protein fraction, was recovered. The pellet, containing the intact sacculi and the bound protein fraction, was resuspended in 100 µL

of Laemmli buffer 1x. Samples of the loaded protein, centrifugation supernatant and pellet were analyzed by SDS-PAGE (12.5%). The same experiment was done with crude sacculi or with sacculi treated for removal of wall teichoic acids.

For cell wall digestion assays, 5  $\mu$ L of RBB-labeled sacculi were incubated overnight at 37°C with 5  $\mu$ M GST-Pmp23 or 4  $\mu$ M mutanolysin, as a positive control, in 100  $\mu$ L buffer C. Reactions were terminated by incubation for 5 min at 95°C. Soluble cleavage products were separated by centrifugation (21,000g for 10 min) at room temperature. The supernatant was collected, and the absorbance was measured at 595 nm. Alternatively, 20  $\mu$ L of unlabeled sacculi were incubated overnight at 37°C with 5  $\mu$ M GST-Pmp23 or 4  $\mu$ M mutanolysin in 100  $\mu$ L buffer C. To monitor sacculi digestion, the absorbance of the reactions was measured over time at 595 nm.

### **Cell fractionation and immunoprecipitation of Pmp23**

For cell fractionation, *S. pneumoniae* spMJ15 strain were grown in 10 mL of CY medium containing 0.15 mM ZnCl<sub>2</sub> for expression of 3xFLAG-Pmp23 until OD<sub>600</sub> =0.3. Cells were harvested by centrifugation and cell supernatant was kept and concentrated until 50  $\mu$ L. Cells were resuspended in 1 ml of Buffer D (20 mM MES acid pH 6.5, 500 mM sucrose, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ g/ml lysozyme (Sigma), 4 $\mu$ g/ml mutanolysin (Sigma) and containing a protease inhibitor cocktail (Complete with or without EDTA, Roche)) during 1 h at 37°C in order to extract cell wall anchored proteins. Protoplast pellet were centrifuged, supernatant containing cell wall proteins were concentrated and kept at 4°C for analysis. Protoplasts were resuspended in a buffer E (50 mM pH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, and 10 mM MgCl<sub>2</sub> supplemented with 5  $\mu$ g/mL DNase and RNase). After ultracentrifugation, cytoplasmic supernatant was recovered and concentrated while membrane pellet fraction was resuspended in Tris buffer supplemented with 10mM DMM and incubated on wheel overnight at 4°C. Samples were separated by 12.5% SDS-PAGE and subjected to western blotting using anti-FLAG antibody (1/2.000; F3165, Sigma).

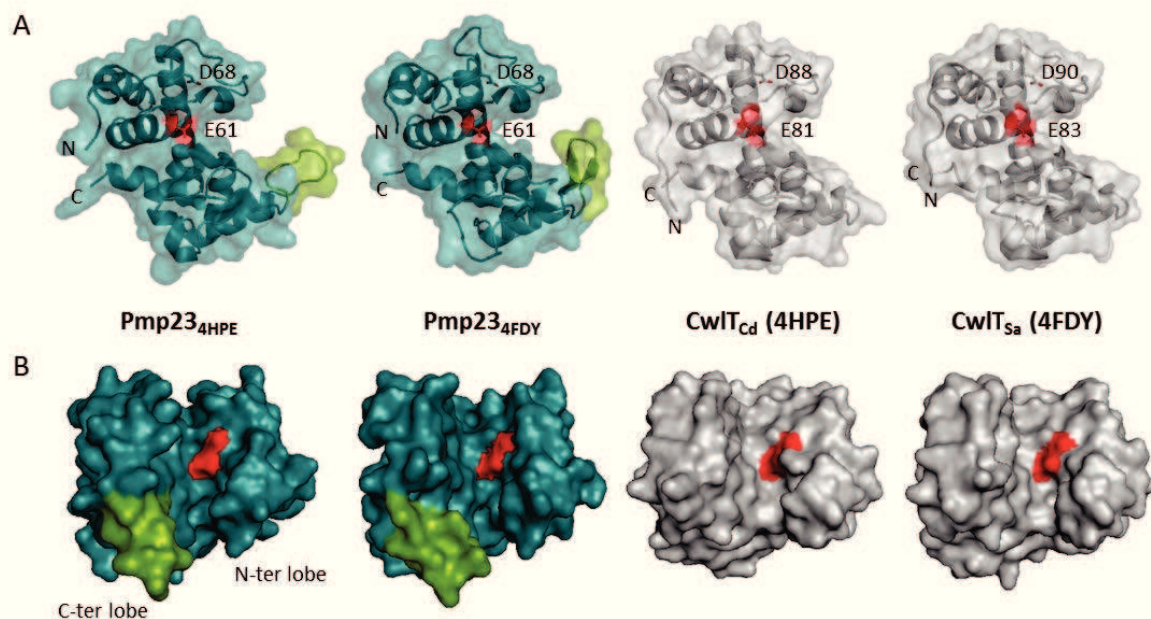
Immunoprecipitation experiments was adapted from Sham and al (Sham et al., 2011). One-liter culture of the *S. pneumoniae* spMJ15 strain were grown in TH medium containing 0.15 mM ZnCl<sub>2</sub> for expression of 3xFLAG-Pmp23. Cells were harvested, resuspended in 10 ml of Buffer D and incubated at 37°C until most of the population could be visualized as protoplast under phase-contrast microscopy (usually 2-3 h). Protoplast pellet was frozen in dry ice, resuspended in 3 ml of buffer E supplemented with 2% Triton X-100 and incubated on wheel

during 2 h at 4°C. Debris were pelleted by ultracentrifugation (140,000 g for 30 min at 4°C) and the supernatant containing solubilized membrane proteins was collected. For each immunoprecipitation (IP) experiment, 500µl of solubilized membrane proteins were incubated with 10 µL of anti-FLAG affinity agarose resin (Sigma-Aldrich). After 5h of incubation at 4°C with gentle shaking, the resin was washed three times before elution of the retained proteins with 75 µL of 100ng/µl FLAG peptide (Sigma-Aldrich). Samples were separated by 12.5% SDS-PAGE and subjected to western blotting using appropriate sera dilutions.

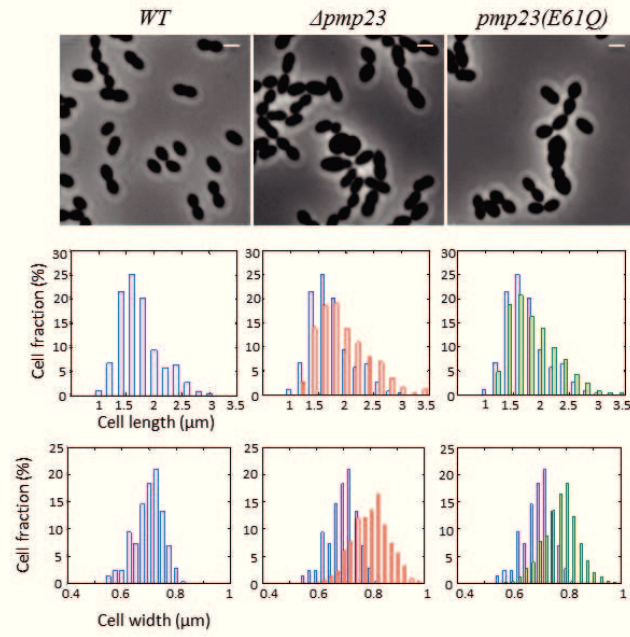
### **Fluorescence microscopy acquisition and analysis.**

Cells were grown at 37°C in CY until  $OD_{600} = 0.3$ , transferred to microscope slides, and observed at room temperature using an Olympus BX61 optical microscope equipped with a UPFLN 100x O-2PH/1.3 objective and a QImaging Retiga-SRV 1394 cooled charge-coupled-device (CCD) camera. Images were acquired using the Volocity software package. Image analysis was performed using the MicrobeTracker Matlab software.

For labeling of cell wall synthesis regions, cells were grown in CY until  $OD_{600} = 0.3$ , pelleted at room temperature for 5 min at 4,000g, resuspended and incubated for 4 min in CY supplemented with 0.1 mM BADA (Kuru et al., 2015). Cells were finally washed twice to discard unbound dye, resuspended into prewarmed medium and incubated for 4 min at 37°C prior to microscopy observation.

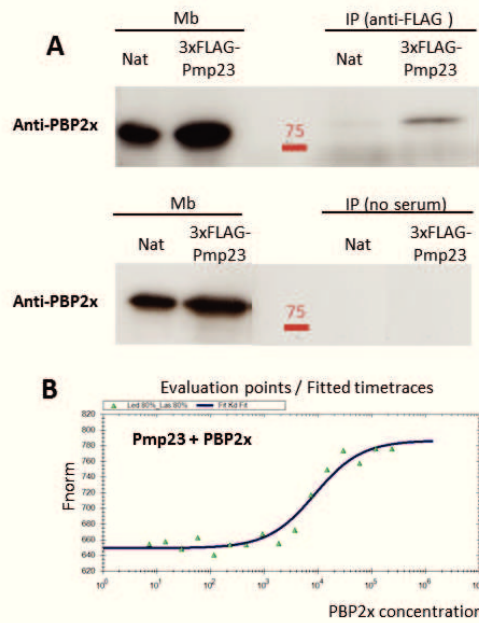


**Figure S1. Homology modeling of Pmp23 and comparison with bacterial lysozyme structures. A.** Ribbon and surface representation of the Pmp23 homology models (Pmp23<sub>4HPE</sub> and Pmp23<sub>4FDY</sub>) and comparison with their CwlT templates from *C. difficile* (CwlT<sub>Cd</sub>, PDB code 4HPE) and *S. aureus* (CwlT<sub>sa</sub>, PDB code 4FDY). The insertion region that partially hampers access to the active site in Pmp23 models is in chartreuse. The Glu and Asp residues shown to be required for CwlT activity in *B. subtilis* (Fukushima et al., 2008) are labeled and shown in sticks and the general acid is colored red. The N- and C-termini are labeled. **B.** Alternative views of the surface representation of the Pmp23 models and their CwlT templates. The insertion region that partially hampers access to the active site in Pmp23 models is in chartreuse and the catalytic Glu is in red. The positions of the C-terminal and N-terminal lobes are indicated.

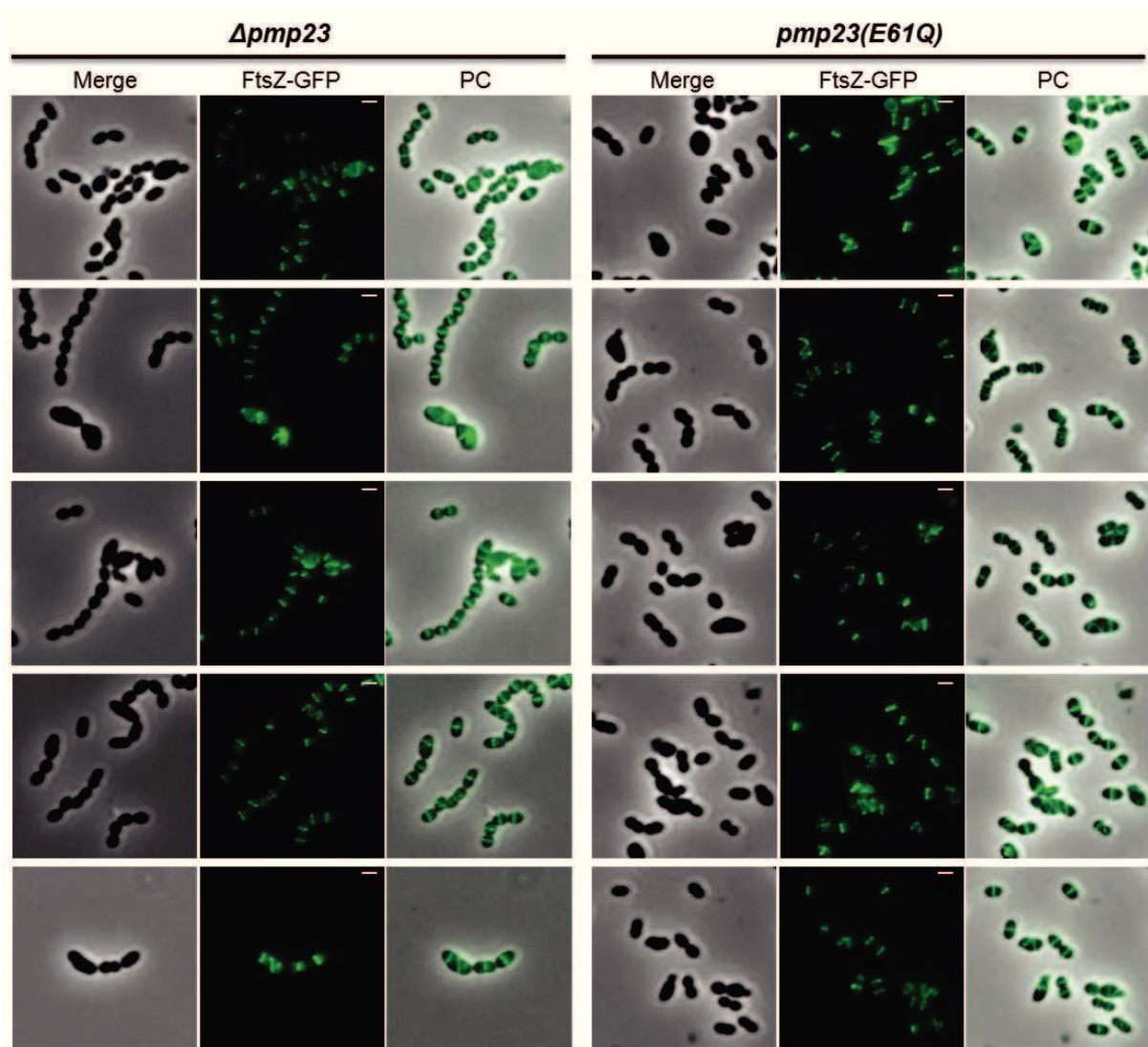


**Figure S2. Characterization of *S. pneumoniae* morphology and growth when Pmp23 is inactivated.** Phase contrast images of exponentially growing cells from wild-type (*WT*),  $\Delta pmp23$  and *pmp23(E61Q)* *S. pneumoniae* strains. Scale bars = 1  $\mu\text{m}$ . Below each image, histograms show the distribution of cell length and width among the cell population.

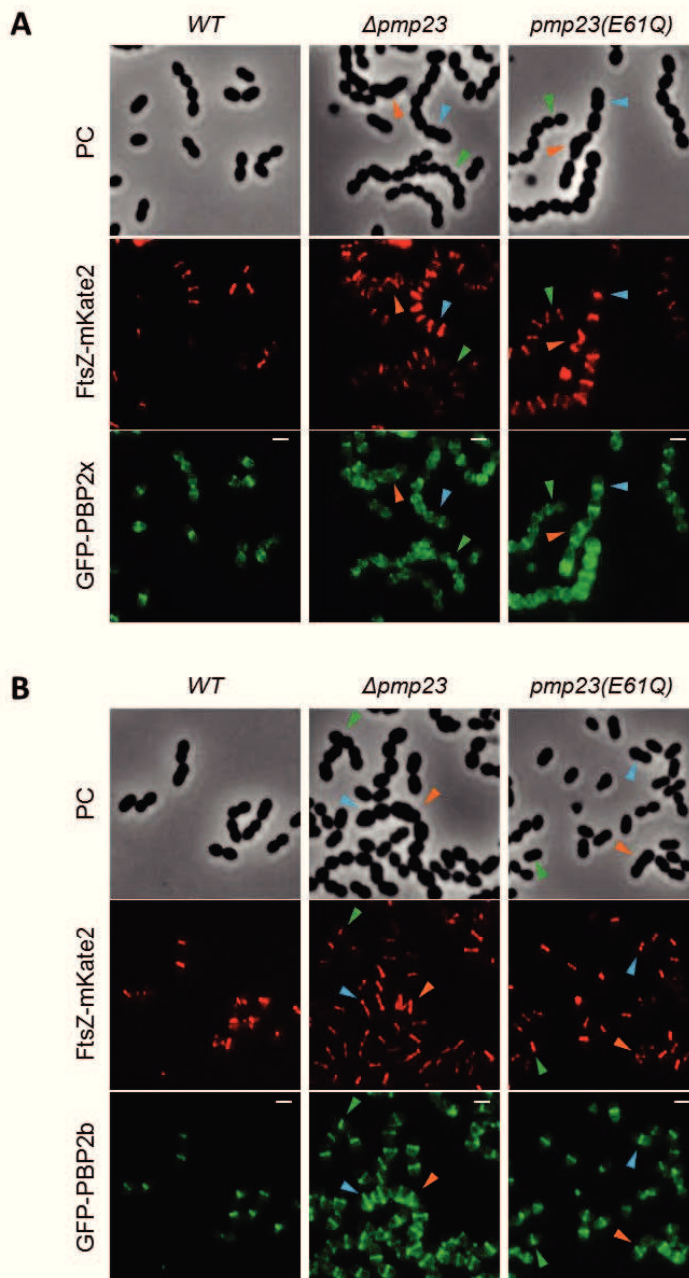




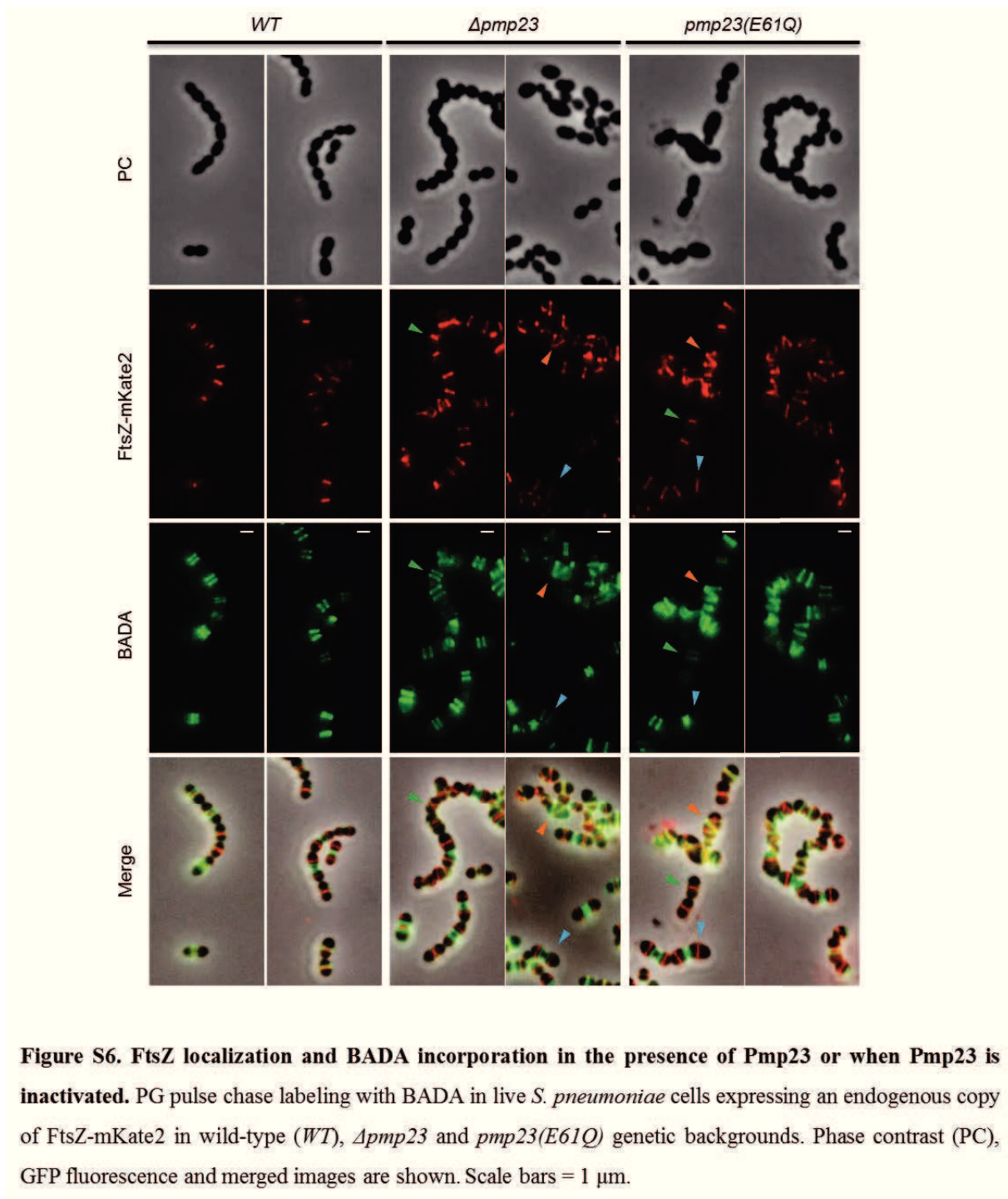
**Figure S3. Pmp23 interacts with PBP2x.** **A.** Membrane proteins from *S. pneumoniae* cells expressing the native copy of Pmp23 (Nat) or an ectopic 3xFLAG-Pmp23 fusion were solubilized with Triton X-100 and used for immunoprecipitation experiments, performed in the presence (upper panels) or in the absence (lower panels) of anti-FLAG resin. The analyzed samples correspond to the solubilized membrane proteins (Mb) and the immunoprecipitated fractions (IP). **B.** Affinity measurements by Microscale Thermophoresis of labeled Pmp23-GST binding to increasing concentrations of PBP2x. Fnorm (normalized fluorescence = fluorescence after thermophoresis / initial fluorescence) is reported on the Y axis and ligand concentrations on the x-axis are plotted in nM. Measures are represented by green dots and the fitted curve by a blue line.

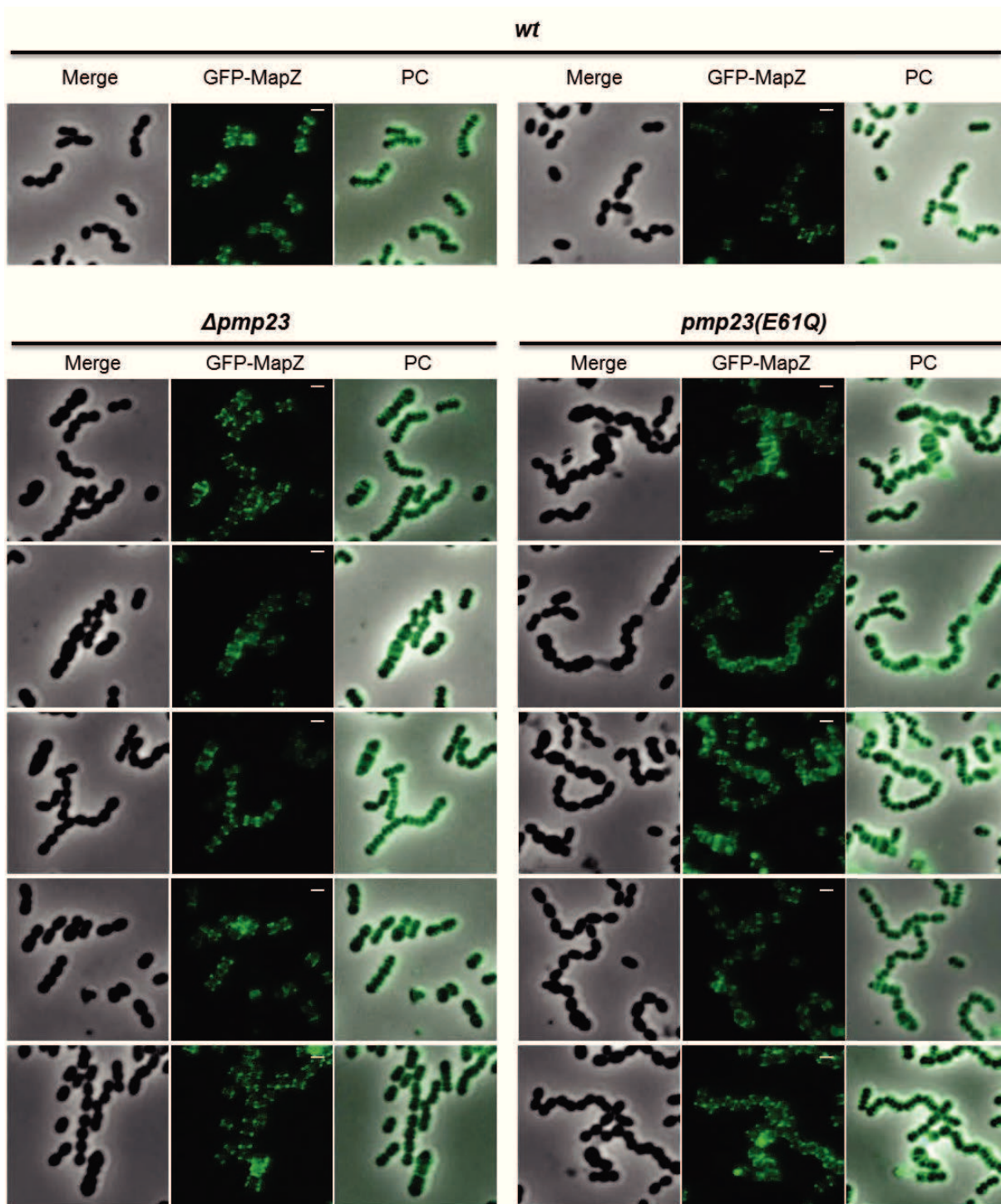


**Figure S4. FtsZ localization in the presence of Pmp23 or when Pmp23 is inactivated.** Live *S. pneumoniae* cells expressing an endogenous copy of FtsZ-GFP in *Δpmp23* and *pmp23(E61Q)* genetic backgrounds. Phase contrast (PC), GFP fluorescence and merged images are shown. Scale bars = 1  $\mu$ m.



**Figure S5. FtsZ and PBP2x or PBP2b localization in the presence of Pmp23 or when Pmp23 is inactivated.** Live *S. pneumoniae* cells expressing an endogenous copy of FtsZ-RFP and either GFP-PBP2X (A) or GFP-PBP2B (B) in wild-type (*WT*),  $\Delta pmp23$  and  $pmp23(E61Q)$  genetic backgrounds. Phase contrast (PC), GFP fluorescence and merged images are shown. Scale bars = 1  $\mu$ m.





**Figure S7. MapZ localization in the presence of Pmp23 or when Pmp23 is inactivated.** Live *S. pneumoniae* cells expressing an endogenous copy of GFP-MapZ in wild-type (WT), *Δpmp23* and *pmp23(E61Q)* genetic backgrounds. Phase contrast (PC), GFP fluorescence and merged images are shown. Scale bars = 1  $\mu$ m.

**Table S1. Muropeptides composition in presence or absence of Pmp23.**

This table summarizes the muropeptides of *S. pneumoniae* R800 or  $\Delta pmp23$  genetic background strain that could be detected by mass spectrometry

Peak No	Muropeptide	R800 (I)	R800 (II)	$\Delta pmp23$ (I)	$\Delta pmp23$ (II)
1	Tri (Glu)	1.53	1.73	1.70	1.50
2	Tri [deAc]	9.65	9.36	8.08	9.10
3	Tri	13.68	14.22	13.88	12.53
4	Tri(A) or Tetra	0.99	0.94	0.59	0.85
5	Penta[deAc]	0.99	0.92	0.81	0.92
6	Penta[Gly]	0.55	0.59	0.53	0.45
7	Penta	1.44	1.50	1.42	1.19
8	Tri(SA)[Glu]	0.36	0.34	0.29	0.33
9	Tris(S)	0.39	0.36	0.45	0.30
10	Tetra(S)[Glu/deAc]	2.25	2.41	1.80	1.64
11	Tetra(A)	0.47	0.52	0.53	0.41
12	Tri(SA)	2.61	2.84	2.48	2.20
13	Tri(AA)[deAc]/Tetra(S)	0.63	0.89	0.44	0.53
14	Tri(AA)	0.87	0.87	0.70	0.62
New Peak	Unknown (presumably TetraTri [deAc] <sub>2</sub> )	4.04	3.75	3.22	4.82
17	TetraTri[deAc]	3.72	3.49	3.40	4.04
18	TetraTri[deAc]	6.50	6.47	6.53	6.96
19	TetraTri	8.83	8.98	9.95	9.32
20	Tetra(SA)Tri[deAc]	1.43	1.40	1.26	1.55
21	Tetra(SA)Tri[deAc]	2.84	2.97	3.03	3.26
23	Tetra(SA)Tri	3.74	4.09	4.73	4.07
24	TetraTri(SA)[deAc]	0.80	0.67	0.78	0.76
25	Tetra(AA)Tri	1.88	1.95	2.01	2.04
26	TetraTri(SA)	1.03	1.00	1.11	1.06
27	TetraTri(SA) <sub>2</sub> [deAc]/TetraTri(AA)(SA)[deAc]	0.88	0.95	0.92	0.94
28	TetraTri(SA) <sub>2</sub> [deAc]	0.73	0.73	0.66	0.65
29	TetraTetraTri[deAc] <sub>2</sub> -GM]	0.90	0.87	0.91	0.81
Sum of peaks *		73.73	74.81	72.21	72.85
Monomers		49.38	50.11	46.67	44.71
Dimers		49.40	48.72	52.07	54.18
Trimers		1.22	1.16	1.26	1.11
% peptides in cross linkage		50.62	49.89	53.33	55.29

\* was set as 100% for the calculations

## REFERENCES

- Abdullah, M.R., Gutiérrez-Fernández, J., Pribyl, T., Gisch, N., Saleh, M., Rohde, M., Petruschka, L., Burchhardt, G., Schwudke, D., Hermoso, J.A., et al. (2014). Structure of the pneumococcal L,d-carboxypeptidase DacB and pathophysiological effects of disabled cell wall hydrolases DacA and DacB. *Mol. Microbiol.* *93*, 1183–1206.
- Barendt, S.M., Sham, L.-T., and Winkler, M.E. (2011). Characterization of Mutants Deficient in the L,D-Carboxypeptidase (DacB) and WalRK (VicRK) Regulon, Involved in Peptidoglycan Maturation of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 2 Strain D39. *J. Bacteriol.* *193*, 2290–2300.
- Bartual, S.G., Straume, D., Stamsås, G.A., Muñoz, I.G., Alfonso, C., Martínez-Ripoll, M., Håvarstein, L.S., and Hermoso, J.A. (2014). Structural basis of PcsB-mediated cell separation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Commun.* *5*, 3842.
- Benkert, P., Biasini, M., and Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *27*, 343–350.
- Berg, K.H., Stamsås, G.A., Straume, D., and Håvarstein, L.S. (2013). Effects of low PBP2b levels on cell morphology and peptidoglycan composition in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J. Bacteriol.* *195*, 4342–4354.
- Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J., and Schwede, T. (2009). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat. Protoc.* *4*, 1–13.
- Egan, A.J.F., and Vollmer, W. (2013). The physiology of bacterial cell division: Bacterial cell division. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1277*, 8–28.
- Erickson, H.P., Anderson, D.E., and Osawa, M. (2010). FtsZ in Bacterial Cytokinesis: Cytoskeleton and Force Generator All in One. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *74*, 504–528.
- Fleurie, A., Cluzel, C., Guiral, S., Freton, C., Galisson, F., Zanella-Cleon, I., Di Guilmi, A.-M., and Grangeasse, C. (2012). Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* *83*, 746–758.
- Fleurie, A., Manuse, S., Zhao, C., Campo, N., Cluzel, C., Lavergne, J.-P., Freton, C., Combet, C., Guiral, S., Soufi, B., et al. (2014a). Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. *PLoS Genet.* *10*, e1004275.
- Fleurie, A., Lesterlin, C., Manuse, S., Zhao, C., Cluzel, C., Lavergne, J.-P., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Combet, C., Kuru, E., et al. (2014b). MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* *516*, 259–262.
- Fukushima, T., Kitajima, T., Yamaguchi, H., Ouyang, Q., Furuhashi, K., Yamamoto, H., Shida, T., and Sekiguchi, J. (2008). Identification and characterization of novel cell wall

- hydrolase CwlT: a two-domain autolysin exhibiting n-acetylmuramidase and DL-endopeptidase activities. *J. Biol. Chem.* *283*, 11117–11125.
- van Heijenoort, J. (2011). Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *MMBR 75*, 636–663.
- Hoyland, C.N., Aldridge, C., Cleverley, R.M., Duchêne, M.-C., Minasov, G., Onopriyenko, O., Sidiq, K., Stogios, P.J., Anderson, W.F., Daniel, R.A., et al. (2014). Structure of the LdcB LD-carboxypeptidase reveals the molecular basis of peptidoglycan recognition. *Struct. Lond. Engl.* *1993 22*, 949–960.
- Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C.J., Braun, D., Baaske, P., and Duhr, S. (2011). Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev. Technol.* *9*, 342–353.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* *10*, 845–858.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* *305*, 567–580.
- Kuru, E., Tekkam, S., Hall, E., Brun, Y.V., and Van Nieuwenhze, M.S. (2015). Synthesis of fluorescent D-amino acids and their use for probing peptidoglycan synthesis and bacterial growth in situ. *Nat. Protoc.* *10*, 33–52.
- Lacks, S., and Hotchkiss, R.D. (1960). Formation of amyloamylase after genetic transformation of pneumococcus. *Biochim. Biophys. Acta* *45*, 155–163.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., and Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* *42*, D490–D495.
- Massidda, O., Nováková, L., and Vollmer, W. (2013). From models to pathogens: how much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division? *Environ. Microbiol.* *15*, 3133–3157.
- Monahan, L.G., Liew, A.T.F., Bottomley, A.L., and Harry, E.J. (2014). Division site positioning in bacteria: one size does not fit all. *Front. Microbiol.* *5*, 19.
- Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003). Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol. Microbiol.* *50*, 845–855.
- Morlot, C., Noirclerc-Savoye, M., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2004). The d,d-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* *51*, 1641–1648.



- Morlot, C., Pernot, L., Le Gouellec, A., Di Guilmi, A.M., Vernet, T., Dideberg, O., and Dessen, A. (2005). Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* *280*, 15984–15991.
- Morlot, C., Bayle, L., Jacq, M., Fleurie, A., Tourcier, G., Galisson, F., Vernet, T., Grangeasse, C., and Di Guilmi, A.M. (2013). Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in *Streptococcus pneumoniae* R6 morphogenesis. *Mol. Microbiol.* *90*, 88–102.
- Ng, W.-L., Kazmierczak, K.M., and Winkler, M.E. (2004). Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator. *Mol. Microbiol.* *53*, 1161–1175.
- Pagliari, E., Dideberg, O., Vernet, T., and Di Guilmi, A.M. (2005). The PECACE domain: a new family of enzymes with potential peptidoglycan cleavage activity in Gram-positive bacteria. *BMC Genomics* *6*, 19.
- Pagliari, E., Dublet, B., Frehel, C., Dideberg, O., T, V., and Am, D.G. (2008). The Inactivation of a New Peptidoglycan Hydrolase Pmp23 Leads to Abnormal Septum Formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Open Microbiol. J.* *2*, 107–114.
- Philippe, J., Gallet, B., Morlot, C., Denapaite, D., Hakenbeck, R., Chen, Y., Vernet, T., and Zapun, A. (2015). Mechanism of  $\beta$ -lactam action in *Streptococcus pneumoniae*: the piperacillin paradox. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 609–621.
- Pilhofer, M., Aistleitner, K., Biboy, J., Gray, J., Kuru, E., Hall, E., Brun, Y.V., VanNieuwenhze, M.S., Vollmer, W., Horn, M., et al. (2013). Discovery of chlamydial peptidoglycan reveals bacteria with murein sacculi but without FtsZ. *Nat. Commun.* *4*, 2856.
- Potluri, L.-P., Kannan, S., and Young, K.D. (2012). ZipA Is Required for FtsZ-Dependent Preseptal Peptidoglycan Synthesis prior to Invagination during Cell Division. *J. Bacteriol.* *194*, 5334–5342.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 234–258.
- Schuster, C., Dobrinski, B., and Hakenbeck, R. (1990). Unusual septum formation in *Streptococcus pneumoniae* mutants with an alteration in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3. *J. Bacteriol.* *172*, 6499–6505.
- Sham, L.-T., Barendt, S.M., Kopecky, K.E., and Winkler, M.E. (2011). Essential PcsB putative peptidoglycan hydrolase interacts with the essential FtsXSpn cell division protein in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, E1061–E1069.
- Smith, T.J., Blackman, S.A., and Foster, S.J. (2000). Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiol. Read. Engl.* *146 (Pt 2)*, 249–262.





# Conclusions et perspectives

---

La division bactérienne est un processus complexe qui nécessite la coordination de divers processus dans le but de former deux cellules filles identiques à la cellule mère. L'un des processus essentiels à la division est la synthèse du PG, un exosquelette composé de polymères de sucres réticulés par des chaînes peptidiques, qui confère sa forme à la bactérie. Un défi majeur pour la bactérie est de parvenir à insérer du nouveau matériel dans le PG préexistant et de le remodeler, tout en préservant la forme et l'intégrité de la cellule. Le modèle couramment proposé est que les activités de synthèse et de dégradation du PG qui sont nécessaires à son expansion et son remodelage sont coordonnées au sein de machineries protéiques spécialisées. Une quantité importante d'informations concernant la composition de ces machineries, les interactions moléculaires et les fonctions enzymatiques qu'elles impliquent sont disponibles. Malgré cela, leur organisation dans la cellule et les mécanismes qui régulent leur localisation, leur assemblage et leur activité restent encore à élucider. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à deux aspects importants de ce problème:

- Quelle est l'architecture adoptée par l'anneau Z pour parvenir à échafauder les machineries de synthèse du PG nécessaires à l'élongation et à la division ?
- Pourquoi certaines hydrolases de la paroi sont-elles nécessaires aux processus de division et de synthèse du PG ?

Pour répondre à la première question, j'ai développé l'usage d'une nouvelle technique de microscopie super-résolue chez le pneumocoque pour atteindre une résolution d'imagerie de l'ordre de la dizaine de nanomètres (le PALM). L'ingénierie d'une protéine fluorescente utilisable en PALM (spDendra2) a été déterminante pour le succès de ce travail et constitue un outil qui a déjà été utile à d'autres groupes dans le monde souhaitant réaliser des études de PALM chez les bactéries. Afin de déterminer quelle a été la contribution de chacune des modifications apportées (optimisation de l'usage des codons ou ajout des extrémités N- et C-terminales de la GFP à Dendra2) aux performances de la protéine spDendra2, il serait aujourd'hui intéressant de construire une souche exprimant un gène de fusion entre *ftsZ* et *dendra2*, dont la séquence nucléique sera optimisée pour l'expression dans le pneumocoque, sans modification des extrémités N- et C-terminales de la protéine. En parallèle, il faudra construire une souche exprimant un gène de fusion entre *ftsZ* et le gène *dendra2* non optimisé pour l'expression dans le pneumocoque, mais portant les extrémités N- et C-terminales de la

GFP. Cette étude permettrait de déterminer quelle est la meilleure stratégie pour améliorer les propriétés des protéines de fusion fluorescentes chez le pneumocoque, et peut-être même chez les bactéries en général.

Alors qu'en microscopie à fluorescence conventionnelle l'anneau Z apparaît continu et homogène, nos études PALM ont montré qu'il est en fait composé d'amas protéiques ("clusters") hétérogènes, observés également chez *E. coli* et *C. crescentus*. Les mécanismes à l'origine de la formation des amas de FtsZ restent à ce jour inconnu et pourraient faire intervenir les protéines partenaires de FtsZ (MapZ, FtsA, SepF, ZapA, EzrA). Des études en PALM double couleur pour étudier la nanostructure de ces protéines et de FtsZ au sein d'une même cellule sont maintenant nécessaires à l'élucidation des mécanismes qui régulent l'architecture de l'anneau Z.

On peut également se demander quelles sont les implications de la structure granuleuse de l'anneau dans les fonctions de FtsZ. FtsZ est décrite comme ayant deux fonctions principales, le recrutement de protéines au site de division et la constriction de la membrane. Une hypothèse simple est que le regroupement des filaments de FtsZ en amas permette de consolider les points d'ancrage des machineries de synthèse du PG. De manière étonnante, deux études en 3D-SIM chez *S. pneumoniae* ont montré que de nombreuses protéines de la synthèse du PG adoptent une localisation ponctuelle mais majoritairement non chevauchante avec la localisation de FtsZ (Land et al., 2013; Tsui et al., 2014). De plus, il faut rappeler que, lors de la constriction, les protéines de synthèse de la paroi présentent toutes un retard de localisation comparé à l'anneau Z en microscopie à fluorescence conventionnelle (voir figure 11, introduction). Dès lors, il est possible que les amas ("clusters") de FtsZ, en début de cycle, servent de plateformes de recrutement suffisamment larges pour accueillir les très nombreux composants des machineries de division et de la synthèse de la paroi. Une fois les machineries assemblées, elles pourraient se désolidariser de l'anneau Z. L'étude en PALM, simple puis double couleur, des protéines de synthèse de la paroi permettra de déterminer à l'échelle du nanomètre les relations spatio-temporelles entre l'anneau Z et les machineries de synthèse de la paroi.

Plusieurs études ont proposé que l'anneau Z génère une force contractile nécessaire à la division. La structure granuleuse de l'anneau Z ne s'oppose pas à l'idée d'une contraction localisée des filaments de FtsZ, dont la concentration en amas pourrait permettre de générer une force suffisante à la constriction membranaire. La présence de zones de moins forte densité en FtsZ pourrait par ailleurs éviter un problème d'encombrement stérique au cours de

la constriction, lorsque le diamètre de l'anneau diminue alors que le nombre de molécules reste équivalent. Toutefois, l'idée que FtsZ fournisse la force de constriction nécessaire à la division reste largement controversée et récemment, une étude en PALM chez *E. coli* a montré que la perturbation des propriétés de l'anneau Z (activité GTPase, densité de l'anneau, dynamique de renouvellement des molécules au sein de l'anneau) ne modifiait pas la vitesse de fermeture du septum, suggérant que FtsZ ne joue qu'un rôle mineur dans la constriction de la membrane (Coltharp et al., 2016). Il serait intéressant de tester cette hypothèse chez *S. pneumoniae*, chez qui une constriction de la membrane peut être observée même lorsque la synthèse du septum est inhibée (Philippe et al., 2015).

Lors de la constriction, nous avons observé une augmentation de largeur de l'anneau de 32 nm entre les cellules en début de division et celle en cours de constriction. Chez *E. coli* et *C. crescentus*, des données contradictoires existent puisqu'un élargissement de l'anneau Z le long de l'axe longitudinal au cours de la constriction n'a été rapporté que dans la moitié des études en PALM/STORM (Biteen et al., 2012; Coltharp et al., 2016; Holden et al., 2014; Vedyaykin et al., 2016). Chez les ovocoques, cet élargissement pourrait être lié à la présence d'un double anneau Z. Cette nouvelle structure, observée dans les cellules en phase pré-divisionnelle, fait écho à l'observation de doubles anneaux de DivIVA chez *B. subtilis* et de doubles anneaux de MapZ, une protéine impliquée dans le positionnement de FtsZ chez les ovocoques (Eswaramoorthy et al., 2011; Fleurie et al., 2014b). La protéine DivIVA est localisée au septum en cours de constriction par reconnaissance de la courbure de la membrane (Lenarcic et al., 2009). Chez *B. subtilis*, lors de la constriction, DivIVA forme une double structure annulaire de part et d'autre du septum nouvellement formé (Eswaramoorthy et al., 2011). En microscopie à fluorescence conventionnelle chez *S. pneumoniae*, une fusion DivIVA-GFP est observée au septum avec un faible signal en phase pré-divisionnelle, puis son signal septal augmente peu de temps avant la constriction (Beilharz et al., 2012; Fleurie et al., 2014a). Il serait intéressant de déterminer si chez le pneumocoque, DivIVA forme également un double anneau, et dans ce cas, s'ils co-localise avec le double anneau Z. Sachant que DivIVA est impliquée dans l'orchestration de la synthèse de paroi dédiée à l'élongation et à la division (rôle d'interrupteur moléculaire joué par la triade DivIVA/StkP/GpsB, voir p. 43), les doubles anneaux Z pourraient être connectés à des doubles anneaux de DivIVA pour positionner la machinerie de synthèse de paroi dédiée à l'élongation du pneumocoque. Alternativement, La formation de ces anneaux pourrait être liée à l'interaction de FtsZ avec MapZ. Il est possible d'imaginer que lorsque l'anneau unique de MapZ se scinde en deux, il

entraîne la partition de l'anneau Z. Comme pour les anneaux de MapZ, la synthèse de PG dédiée à l'élongation écarterait également les deux anneaux de FtsZ. Toutefois, il semble que l'éloignement des anneaux Z soit bien plus limité que celui des anneaux de MapZ (qui restent aux sites de division des futures cellules filles) puisque ces derniers peuvent être observés en microscopie à fluorescence conventionnelle, alors que les doubles anneaux Z sont très rarement observés avec cette technique. Nous pouvons donc proposer que l'éloignement des anneaux Z ne dure qu'un temps limité, et qu'ils se redirigent ensuite vers le site de division parental, possiblement recrutés par le troisième anneau de MapZ qui apparaît au site de division parental en début de constriction (Fleurie et al., 2014b). Pour tester la pertinence physiologique des doubles anneaux Z, nous pourrions réaliser une étude PALM sur FtsZ dans des mutants perturbés dans la synthèse de paroi dédiée à l'élongation tels que des mutants *AstkP* ou *ΔdivIVA*. Dans ces mutants, nous nous attendrions à ne plus voir de doubles anneaux Z. La synchronisation de cellules de pneumocoque pourrait également déterminer si ces doubles anneaux font partie constituante du cycle cellulaire. Dans ce cas, nous devrions identifier une phase de division pendant laquelle toutes les cellules présentent un double anneau Z. Malheureusement, aucune méthode de synchronisation des cellules de pneumocoque n'existe à ce jour. Pour explorer le rôle de MapZ dans l'apparition de doubles anneaux de FtsZ, nous pourrions également réaliser des expériences de double marquage FtsZ/MapZ en PALM. Une co-localisation PALM des doubles anneaux FtsZ et MapZ supporterait l'idée d'un rôle de MapZ dans l'apparition d'un double anneau Z, toutefois, la résolution du PALM étant limitée à 20-40 nm, une co-localisation des protéines ne signifie pas qu'elles interagissent physiquement.

De façon générale, il est admis que ce sont les protéines de la division localisées dans le cytoplasme, et en particulier FtsZ, qui initient l'assemblage des machineries de synthèse et de remodelage de la paroi. Le fait qu'en retour, certaines des protéines impliquées dans la synthèse et le remodelage de la paroi puissent avoir un rôle sur l'assemblage ou le positionnement des protéines de division cytoplasmiques était au départ de ma thèse, une hypothèse intéressante mais qui n'avait jamais été testée. La seconde partie de ma thèse s'est intéressée à cette question, à travers l'étude de l'hydrolase Pmp23, dont j'ai montré la probable appartenance au groupe des lysozymes bactériens qui clivent les chaînes de sucre dans le PG. Bien que Pmp23 soit capable de se lier au PG, nous n'avons malheureusement pas pu détecter d'activité hydrolytique. Une raison de cette absence d'activité pourrait être que l'activité de Pmp23 nécessite la présence d'un partenaire protéique inconnu ou d'un substrat

particulier, comme cela a été démontré pour quelques autres hydrolases de la paroi (Molina et al., 2009; Morlot et al., 2010; Uehara et al., 2010). Alternativement, il est possible que Pmp23 n'agissent que sur une portion très faible du PG, indétectable dans nos tests enzymatiques.

En revanche notre approche cellulaire de l'étude de Pmp23 a généré des résultats très positifs. Nous avons d'abord montré que c'est l'activité enzymatique de Pmp23 qui est nécessaire au bon fonctionnement de la division cellulaire et non la présence physique de la protéine. Nous avons également montré que l'activité de Pmp23 n'est pas nécessaire à la synthèse de PG mais qu'en revanche, elle est nécessaire à la stabilité des structures annulaires adoptées par les protéines de synthèse de la paroi et de façon plus étonnante, par FtsZ. Pour la première fois, nous avons montré qu'une hydrolase de la paroi, dont l'activité est localisée à l'extérieur de la cellule, est impliquée dans le positionnement d'une protéine localisée à l'intérieur de la cellule, FtsZ. La découverte récente de MapZ, dont la topologie est bitopique, qui interagit avec FtsZ et qui est la première protéine à apparaître au site de division, nous a permis de faire le lien entre Pmp23 et FtsZ. Nous avons montré que Pmp23 est nécessaire à la stabilité des structures de MapZ et qu'en l'absence de son activité hydrolytique, une partie des cellules présente une localisation aberrante de MapZ, ce qui entraîne la délocalisation de FtsZ et par conséquent des PBPs.

Pmp23 et MapZ se lient toutes les deux au PG et Pmp23 possédant vraisemblablement une activité d'hydrolyse du PG, il semble logique que le rôle de Pmp23 sur la stabilité des structures de MapZ transite via le PG. Cependant, il est peu probable que l'activité de Pmp23 soit indispensable à la liaison de MapZ au PG car le phénotype observé dans un mutant Pmp23 n'est pas aussi sévère que celui observé pour un mutant du domaine extracellulaire de MapZ. Deux hypothèses expliquant la délocalisation de MapZ dans un mutant Pmp23 peuvent être envisagés: 1) la maturation du PG (par Pmp23) pourrait augmenter l'affinité de MapZ pour le PG et donc favoriser la localisation septale de MapZ ou 2) Pmp23 pourrait avoir un rôle de contrôle qualité dans la synthèse du PG. Elle pourrait par exemple dégrader certaines chaînes glycanes qui auraient été pontées de façon incorrecte ou dont la position serait incorrecte. Elle pourrait également réguler la longueur des chaînes glycanes. Bien que ce type d'activité de correction ne soit pas détectable par les tests enzymatiques disponibles, il aurait un rôle très important dans le maintien des propriétés physiques du PG (rigidité/élasticité, porosité) et de sa structure tridimensionnelle. Les propriétés du PG ayant certainement une grande influence sur la localisation des protéines qui se lient au PG, Pmp23 aurait un rôle



important dans la régulation de la localisation de ces protéines. Dans le cas de MapZ, la présence de deux domaines, extracellulaire et cytoplasmique, permet la transmission de ce mécanisme de régulation aux protéines cytoplasmiques telle que FtsZ. L'idée que les hydrolases, en modifiant la structure du PG ou en corrigeant des erreurs de synthèse, régulent en retour le positionnement de la plateforme d'assemblage des machineries de division et de synthèse du PG, l'anneau Z, est nouvelle. Pour approfondir cette thèse, des études similaires pourraient maintenant être menées sur d'autres hydrolases telles que PBP3 ou DacB.

# Annexes

---

**Annexe n°I : Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in Streptococcus pneumoniae R6 morphogenesis.**



# Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in *Streptococcus pneumoniae* R6 morphogenesis

C. Morlot,<sup>1,2,3†</sup> L. Bayle,<sup>1,2,3†</sup> M. Jacq,<sup>1,2,3</sup> A. Fleurie,<sup>4</sup>  
G. Tourcier,<sup>1,2,3</sup> F. Galisson,<sup>4</sup> T. Vernet,<sup>1,2,3</sup>  
C. Grangeasse<sup>4\*\*</sup> and A. M. Di Guilmi<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Univ. Grenoble Alpes, IBS, F-38027 Grenoble, France.

<sup>2</sup>CNRS, IBS, F-38027 Grenoble, France.

<sup>3</sup>CEA, IBS, Institut de Biologie Structurale, Pneumococcus Group, F-38027 Grenoble France.

<sup>4</sup>Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Université Lyon 1, CNRS, Université de Lyon, UMR 5086, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon, France.

## Summary

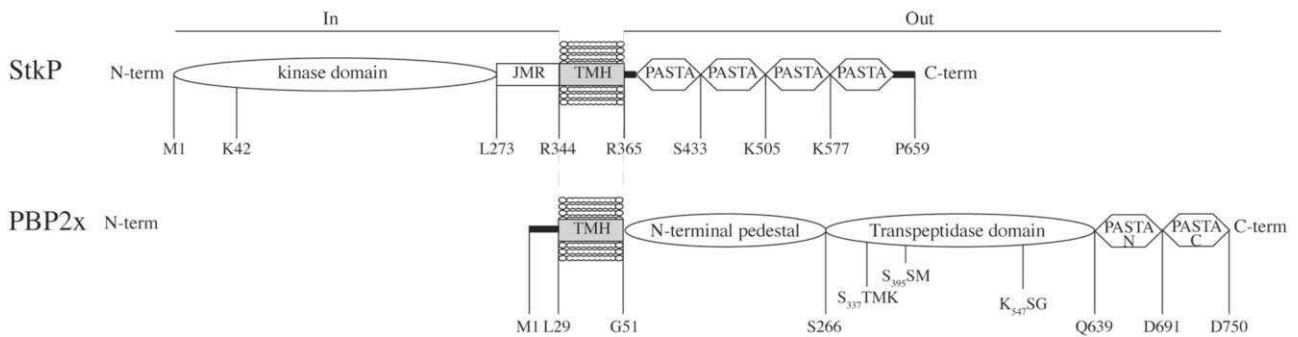
**Bacterial cell growth and division require the co-ordinated action of peptidoglycan biosynthetic enzymes and cell morphogenesis proteins. However, the regulatory mechanisms that allow generating proper bacterial shape and thus preserving cell integrity remain largely uncharacterized, especially in ovococci. Recently, the conserved eukaryotic-like Ser/Thr protein kinase of *Streptococcus pneumoniae* (StkP) was demonstrated to play a major role in cell shape and division. Here, we investigate the molecular mechanisms underlying the regulatory function(s) of StkP and show that it involves one of the essential actors of septal peptidoglycan synthesis, Penicillin-Binding Protein 2x (PBP2x). We demonstrate that StkP and PBP2x interact directly and are present in the same membrane-associated complex in *S. pneumoniae*. We further show that they both display a late-division localization pattern at the division site and that the positioning of PBP2x depends on the presence of the extracellular PASTA domains of StkP. We demonstrate that StkP and PBP2x interaction is mediated by their extracellular regions and that the complex formation is inhibited *in vitro* in the presence of cell wall fragments. These data suggest that the role**

**of StkP in cell division is modulated by an interaction with PBP2x.**

## Introduction

The bacterial cell wall, which determines the shape of bacteria, is remodelled during essential processes like cell division and elongation, but also in response to environmental alterations like sporulation or assembly of surface-exposed pili and flagella. Remodelling of the cell wall is performed by localized multi-membrane protein complexes that co-ordinate peptidoglycan (PG) synthetic and degrading activities. The shape of the ovococcus *Streptococcus pneumoniae* is likely to result from septal and peripheral PG assembly performed by specific morphogenetic machineries (Land and Winkler, 2011; Fleurie *et al.*, 2012). By analogy with the composition of complexes involved in cell elongation and division of rod-shape *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* (Errington *et al.*, 2003; Goehring and Beckwith, 2005; Zapun *et al.*, 2008; Sham *et al.*, 2012), it has been proposed that the septal machinery in *S. pneumoniae* would include FtsZ, EzrA, GpsB, the FtsW flippase (Mohammadi *et al.*, 2011), the heterotrimer DivIB/FtsL/DivIC (Noirclerc-Savoie *et al.*, 2005; Le Gouëllec *et al.*, 2008) and the monofunctional Penicillin-Binding Protein (PBP) PBP2x (Morlot *et al.*, 2003). On the other hand, the peripheral machinery would be formed by MreC, MreD, RodA, GpsB and PBP2b (Land and Winkler, 2011; Zapun *et al.*, 2008). *S. pneumoniae* encodes five high-molecular-weight PBPs required for PG biosynthesis. Three of them (PBP1a, PBP1b and PBP2a) possess glycosyltransferase and transpeptidase domains whereas the other two, PBP2x and PBP2b only harbour a transpeptidase domain. The function of each PBP in PG biosynthesis and morphogenesis remains largely unknown and a glycosyltransferase activity has only been demonstrated for PBP2a (Di Guilmi *et al.*, 2003; Helassa *et al.*, 2012). The role of PBP2x in cell division arose from the observation that *pbp2x* gene is essential and located in a cluster devoted to division (Kell *et al.*, 1993; Massidda *et al.*, 1998). In addition, PBP2x localizes to the septum in *S. pneumoniae* (Morlot *et al.*, 2003) and specific inhibition of the transpeptidase activity of *Lactococcus lactis* PBP2x

Accepted 27 July, 2013. For correspondence. \*E-mail anne-marie.di-guilmi@ibs.fr; Tel. (+33) 4 38 78 56 34; Fax (+33) 4 38 78 55 94; \*\*E-mail c.grangeasse@ibcp.fr; Tel. (+33) 4 72 72 26 88; Fax (+33) 4 72 72 26 41. †Both authors contributed equally to this work.



**Fig. 1.** Topology of *S. pneumoniae* PBP2x and StkP. The transmembrane helix is shown (TMH) in both proteins as well as the juxtamembrane region (JMR) in StkP. The residues involved in the catalytic domains (kinase and transpeptidase) are indicated, as well as the domain boundaries.

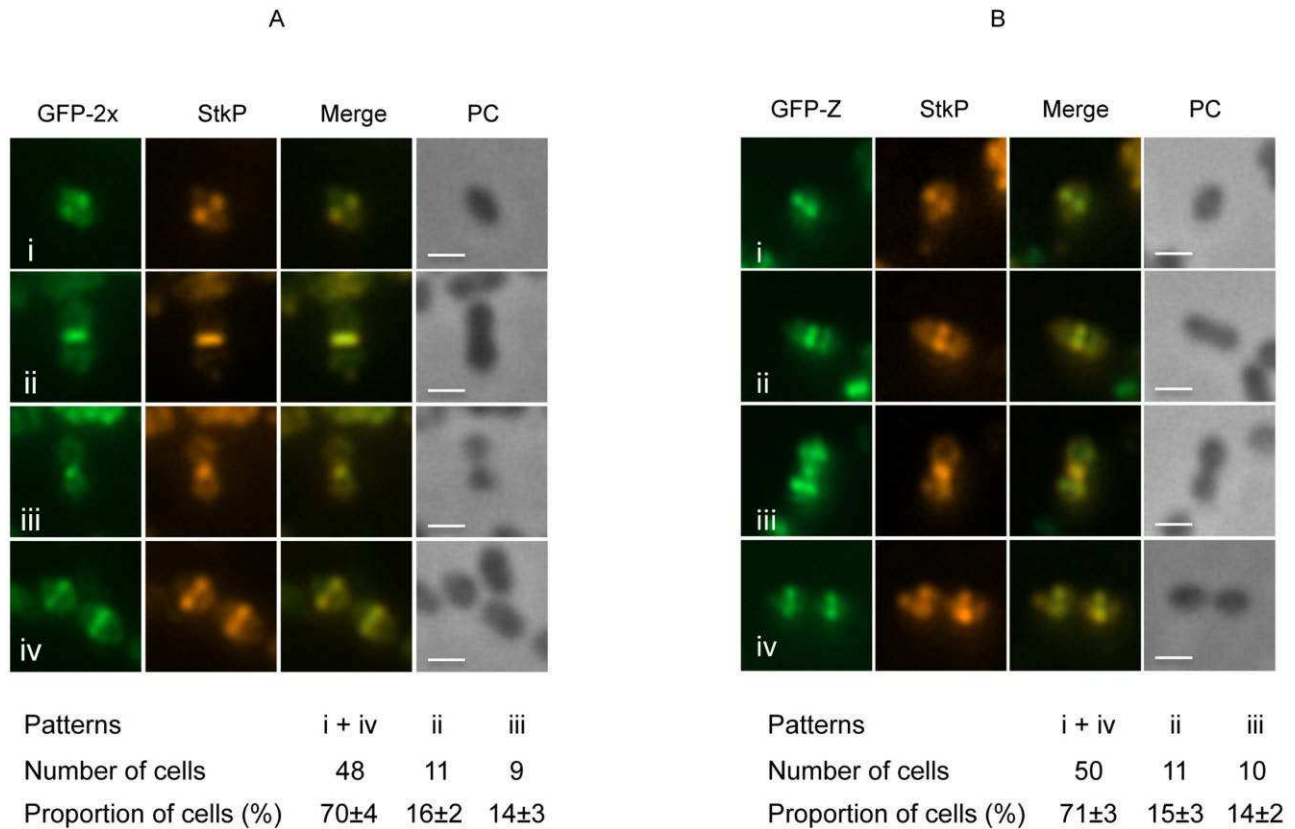
by the  $\beta$ -lactam methicillin leads to the formation of elongated cells (Perez-Nunez *et al.*, 2011).

One important question is how septal and peripheral PG biosynthetic machineries are co-ordinated to allow proper bacterial shape. Although a comprehensive view has been proposed for *E. coli* (Typas *et al.*, 2011), the regulation of these processes in other bacteria, notably in ovococci, remains largely uncharacterized. Conserved membrane eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases (STPK) have been shown to play important roles in the regulation of bacterial cell wall synthesis, cell growth and cell division (Young *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2005; Jin and Pancholi, 2006; Fiuza *et al.*, 2008; Beltramini *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2011). In pneumococcus, a single membrane STPK, named StkP has been identified. StkP is composed of an N-terminal catalytic and cytoplasmic domain displaying the kinase activity (kinase domain, KD) linked to a flexible 65-amino acid long peptide (juxta-membrane region) (Fig. 1). One hydrophobic helix spans the membrane and the extracellular region is made of four PASTA domains (Penicillin-binding proteins And Ser/Thr protein kinase Associated domains) (Fig. 1) (Gordon *et al.*, 2000; Yeats *et al.*, 2002). StkP has been initially described as playing a role in stress resistance, competence, autolysis and virulence (Echenique *et al.*, 2004; Novakova *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2006; Saskova *et al.*, 2007), but recent studies have reported that it also plays a crucial role in pneumococcal cell division (Beilharz *et al.*, 2012; Fleurie *et al.*, 2012). Null mutant strains or strains expressing StkP deleted for the kinase domain display a chaining phenotype composed of round cells, while in the absence of the PASTA domains, cells are elongated and harbour immature septa (Fleurie *et al.*, 2012). StkP localizes at mid-cell and this positioning depends on the presence of both the cytoplasmic kinase domain and the extracellular PASTA region (Beilharz *et al.*, 2012; Fleurie *et al.*, 2012). The role of StkP in cell division is furthermore supported by *in vivo* phosphoproteomic approaches (Sun

*et al.*, 2010) that identified DivIVA as a substrate for StkP (Novakova *et al.*, 2010). In addition, *in vitro* assays revealed that FtsZ and GlmM, an enzyme involved in the first steps of PG precursor synthesis, were phosphorylated by StkP (Novakova *et al.*, 2005; Giefing *et al.*, 2010).

Interestingly in *S. pneumoniae*, the only other protein containing PASTA domains is PBP2x, which harbours two PASTA domains at the C-terminus (Fig. 1) (Pares *et al.*, 1996; Gordon *et al.*, 2000). The structural characterization of a PBP2x variant from a clinical pneumococcus strain resistant to  $\beta$ -lactams showed the presence of a cefuroxime molecule located at the interface between the transpeptidase domain and the PASTA-N domain (Fig. 1) (Gordon *et al.*, 2000). Since  $\beta$ -lactam antibiotics mimic PG moieties, it has been proposed that PASTA domains might bind muropeptides (Yeats *et al.*, 2002). Although no specific binding site(s) have been identified in the PASTA domains, various studies report that PASTA domain-containing kinases like *S. pneumoniae* StkP, *B. subtilis* PkrC, *Mycobacterium tuberculosis* PknB or *Staphylococcus aureus* PknB are able to bind PG and/or precursors muropeptides, but all in the micromolar range (Shah *et al.*, 2008; Paracuellos *et al.*, 2010; Mir *et al.*, 2011; Squeglia *et al.*, 2011). In addition, StkP was shown to bind crude PG preparation from *S. pneumoniae* but not from *S. aureus* (Maestro *et al.*, 2011). In PkrC, the glycan chain and the stem peptide are part of the recognition process (Squeglia *et al.*, 2011). Binding of *M. tuberculosis* PknB to PG requires amidation of the D-isoglutamate into D-isoglutamine and the presence of MurNAc (Mir *et al.*, 2011).

Considering that StkP, like PBP2x, localizes to the septum in *S. pneumoniae* (Giefing *et al.*, 2010; Beilharz *et al.*, 2012; Fleurie *et al.*, 2012), we hypothesized that their respective functions could be linked. In this work, we show that StkP and PBP2x interact with each other through their extracellular regions. In addition, our results



**Fig. 2.** StkP localization compared with PBP2x and FtsZ through the progression of the cell cycle. GFP-PBP2x and GFP-FtsZ encoding genes were inserted into the chromosome in the *bgaA* ectopic site. Pneumococcal R6 cells expressing GFP fusion proteins were stained with a rabbit serum directed against the StkP-PASTA domains (anti-StkP-PASTA) and Cy3-labelled anti-rabbit IgG. The merge pictures show the overlay GFP-PBP2x and StkP (A) and GFP-FtsZ and StkP (B) stainings. Phase-contrast (PC) views are also shown. Scale bars, 1  $\mu$ m.

suggest that the interaction between StkP and PBP2x plays a major role in septal peptidoglycan biosynthesis and the cellular division process of *S. pneumoniae*.

## Results

### *StkP and PBP2x colocalize at the S. pneumoniae division site*

StkP has been shown in independent studies to localize at the pneumococcus division site (Giefing *et al.*, 2010; Beilharz *et al.*, 2012; Fleurie *et al.*, 2012). As Morlot *et al.* showed a temporal dissociation in the localization of two other important proteins of the pneumococcal division, the septal PG synthase PBP2x and the membrane constriction leader FtsZ (Morlot *et al.*, 2003), we wondered which localization pattern StkP would display over the entire cell cycle. To do so, we immunostained StkP, using anti-StkP-PASTA domain serum (residues 365–659, Fig. 1), in a pneumococcal wild-type R6 strain expressing either GFP-PBP2x or GFP-FtsZ fusion proteins (Fig. 2 and Fig. S1). The *gfp* gene was fused to the 5' end of *pbp2x* using the pJWV25

vector, which integrates by double crossing-over in the chromosome between the *bga* and *spr0564* loci (Eberhardt *et al.*, 2009). The constructs were integrated into the pneumococcal R6 genome and the expression of GFP fusion proteins was induced by addition of zinc to the culture medium. We evaluated the amount of GFP-PBP2x and GFP-FtsZ compared with the native PBP2x and FtsZ by Western blots using anti-PBP2x (residues 266–750) and anti-FtsZ (residues 1–419) sera. This analysis revealed that the levels of GFP-PBP2x are slightly higher than the levels of native PBP2x (Fig. S1C) while that the levels of GFP-FtsZ are more than 10-fold lower than the levels of native FtsZ (Fig. S1D). In non-dividing cells, GFP-PBP2x and StkP form two bright dots spanning the mid-cell equatorial site (Fig. 2A, panel i). This feature results from a ring-like structure viewed from the side. In cells displaying septa constriction, the diameter of the ring-like structures formed by GFP-PBP2x and StkP decreased simultaneously to a bright central dot at the end of the division process (Fig. 2A, panels ii and iii). The two proteins finally disappeared from the original septal site and re-localized concomitantly at the future division sites of the new daugh-

ter cells (Fig. 2A, panel iv). In contrast, we observed that StkP colocalized with GFP–FtsZ at the septum site only during the first division stages (Fig. 2B, panels i, ii and iv). Indeed, while GFP–FtsZ rings re-assembled at the future division sites of the newly formed daughter cells, StkP remained mainly associated to the former septal site (Fig. 2B, panel iii). This postponed pattern of StkP relative to GFP–FtsZ localization is in accordance with a previous report (Giefing *et al.*, 2010). In conclusion, PBP2x and StkP colocalize at the cell division site all along the division process and their positioning lags behind the one of FtsZ. These observations suggest that PBP2x and StkP could belong to the same late division complex involved in septal PG synthesis.

#### *StkP and PBP2x form a complex in S. pneumoniae membrane extracts*

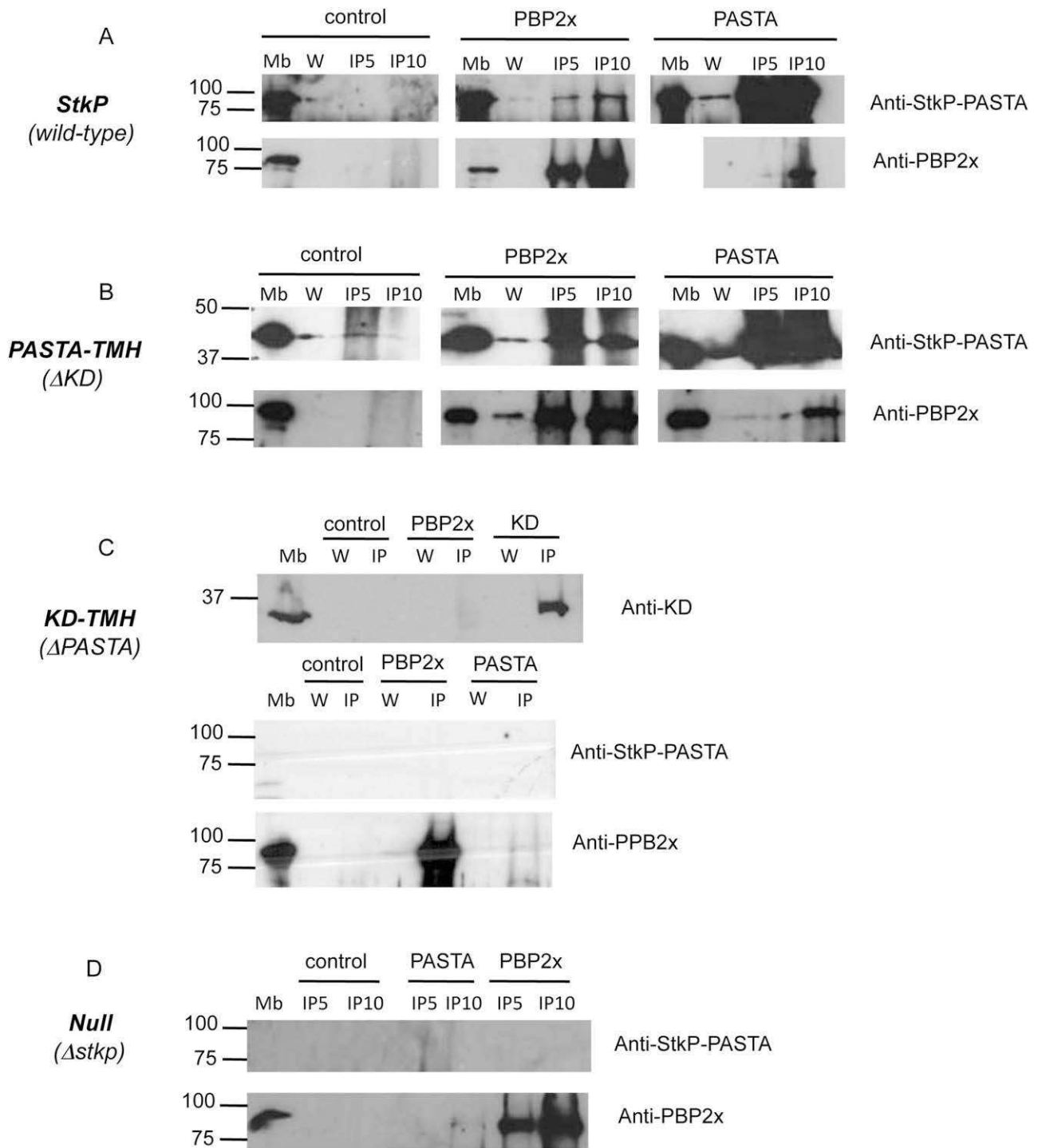
To investigate whether StkP and PBP2x belong to the same macromolecular complex, we performed immunoprecipitation experiments on membrane fractions from the wild-type R6 strain of *S. pneumoniae* (Fig. 3). The membrane proteins were solubilized with Triton X-100, StkP and PBP2x were immunoprecipitated using anti-StkP-PASTA domains and anti-PBP2x sera (Fig. 3). Control experiments were performed in absence of any sera (Fig. 3, control panels). We verified that anti-StkP-PASTA domains and anti-PBP2x antibodies do not cross-react (Fig. 3D). Consistent with the hypothesis that StkP and PBP2x belong to the same complex, PBP2x and StkP were co-immunoprecipitated from the pneumococcal wild-type R6 strain, (Fig. 3A). Considering the dilution factors used to load the samples on the gels, the proportion of co-immunoprecipitated proteins is estimated to be about 2.5% of the PBP2x and StkP proteins present in the membrane fractions. Similar experiments were performed with membranes extracted from a strain expressing a StkP variant deleted from the KD kinase domain ( $\Delta KD$ ) but still expressing the extracellular PASTA domains linked to the transmembrane helix (TMH) (Fig. 3B). PASTA-TMH and PBP2x were co-immunoprecipitated using anti-StkP-PASTA domains or anti-PBP2x sera (Fig. 3B), indicating that the absence of the intracellular kinase domain does not impair the interaction between StkP and PBP2x. To perform the same experiment in the absence of the PASTA domains of StkP ( $\Delta PASTA$ ), we used an anti-KD serum to pull-down KD-TMH. KD-TMH was not co-immunoprecipitated with PBP2x (Fig. 3C), indicating that the PASTA domains of StkP are required for the interaction with PBP2x. As expected, KD-TMH was not immunoprecipitated by the anti-StkP-PASTA domains serum (Fig. 3C). We did not detect StkP nor PBP2x in the immunoprecipitated fractions from the *stkP* null mutant strain (Fig. 3D). Altogether, these results indicate that StkP

and PBP2x interact in *S. pneumoniae* membrane extracts and this interaction is dependent on the presence of the StkP-PASTA domains.

#### *StkP-PASTA domains interact directly with the extracellular region of PBP2x*

To test whether StkP and PBP2x interact directly, we performed pull-down assays with recombinant membrane proteins. Genes encoding full-length (FL) StkP (residues 2–659) and PBP2x (residues 2–750) (Fig. 1) were cloned, either in the same pETDuet vector (pETDuet-His-PBP2xFL-StkP) or separately (pETDuet-His-PBP2xFL and pETDuet-StkP). The poly-histidine tag was fused to the N-terminus end of PBP2x-FL. *E. coli* membrane proteins, solubilized using the CHAPS detergent, were loaded on a Ni-NTA Histidine tag affinity column. The presence of His-PBP2xFL and StkP in the load, wash and elution fractions was monitored by Western blotting using anti-StkP-PASTA domains and anti-PBP2x sera. When StkP and His-PBP2x-FL were coexpressed in *E. coli*, both proteins were found in the eluate fraction (Fig. 4, right panels). Even though smaller quantity (~ 50%) of StkP is pull-down when compared with His-PBP2x, this result indicates that StkP and PBP2x interact directly. Control experiment shows that the untagged StkP was not retained on the affinity column (Fig. 4, upper left panel). Comparing the load and the flow-through fractions in Fig. S2 shows that a large amount of His-PBP2xFL was not retained on the 1 ml Ni-NTA affinity column, indicating that the His-tag might not be fully exposed and/or accessible due to the proximity of the detergent-solubilized transmembrane anchor (Fig. 1).

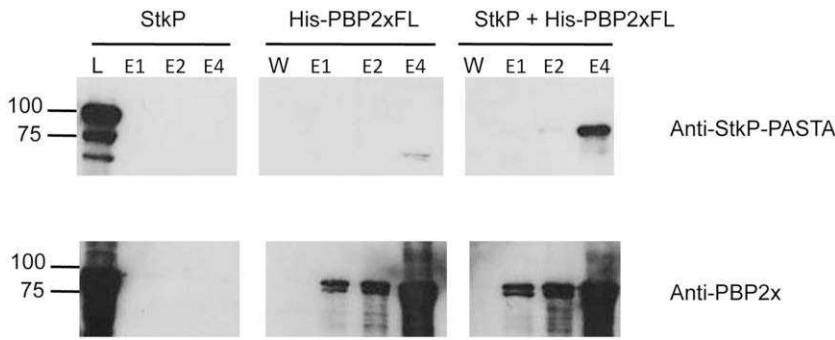
To further map the interacting regions in StkP and PBP2x, we produced different constructs of the extracellular regions of both proteins. First, the full set of StkP-PASTA domains (PASTA-1234) and the extracellular region of PBP2x (PBP2x\*WT as described in Pares *et al.*, 1996) were purified from *E. coli*. Using PBP2x\*WT as a probe, the interaction with PASTA-1234 was revealed by Far Western blotting (Fig. 5A). In order to investigate if a particular set of StkP-PASTA domains is responsible for the interaction with PBP2x, we also produced the isolated domains (PASTA-1, PASTA-2, PASTA-3, PASTA-4) and various combinations (PASTA-123, PASTA-12 and PASTA-23). Association of these variants with PBP2x was tested in a solid-phase assay using a molar ratio of 1:1 and showed that all PASTA combinations interact with PBP2x\*WT (Fig. 5B, upper panel). Comparable binding patterns were obtained when the same set of StkP-PASTA domains was challenged with a PBP2x variant deleted from the PASTA-N and PASTA-C domains (PBP2x\* $\Delta PASTA$ ) (Fig. 5B, middle panel), indicating that the PBP2x-PASTA domains are not necessary for the interaction with StkP. We also produced and purified the



**Fig. 3.** StkP interacts with PBP2x in pneumococcal membrane extracts. Membrane proteins were solubilized with Triton X-100 and used for immunoprecipitation experiments, performed in absence of any serum (control), or with anti-PBP2x rabbit serum or anti-StkP-PASTA domains rabbit serum (the serum used for the IP is indicated on top of each block). The analysed samples correspond to solubilized membrane proteins (Mb), wash (W), 5  $\mu$ l and 10  $\mu$ l of the immunoprecipitated fractions (IP5 and IP10). The anti-PBP2x and anti-StkP-PASTA domains rabbit sera were used for the Western blot detection (indicated on the right of each row).

A. Wild-type strain.  
 B.  $\Delta KD$  mutant strain.  
 C.  $\Delta PASTA$  mutant strain.  
 D.  $\Delta StkP$ -deleted strain.





**Fig. 4.** StkP and PBP2x interact directly. Full-length forms of StkP and His-tagged PBP2x (His-PBP2xFL) were overexpressed in *E. coli* membrane. Total membrane proteins were solubilized with CHAPS and loaded onto a Ni-NTA affinity column (L). After washing, retained proteins were eluted with buffer containing imidazole (elution fractions E1, E2 and E4). Samples were analysed by Western blot using anti-PBP2x and anti-StkP-PASTA rabbit sera as indicated on the right of each row.

two PASTA domains of PBP2x, herein called PBP2x-PASTA. No interaction could be detected between the StkP-PASTA and the PBP2x-PASTA domains (Fig. 5B, lower panel). Altogether, these data are consistent with a model in which the StkP-PASTA domains interact directly with the N-terminal pedestal and/or the transpeptidase domain of PBP2x but not with its PASTA domains.

#### Quantification of PBP2x–StkP interaction by microscale thermophoresis

Microscale thermophoresis analysis (Lippok *et al.*, 2012), which allows sensitive measurements of molecular interactions in solution, was carried out by titrating StkP-PASTA domain binding to PBP2xWT. We used a label-free PBP2xWT supplemented with increasing concentrations of StkP-PASTA domains, and measured the gradient of fluorescent material derived from tryptophan residues of PBP2xWT. Even though steady-state values were not reached (Fig. S3), the data can be used to estimate the range of apparent affinity constants (Table 1). Overall, these results indicate a micromolar range low affinity of PBP2xWT for StkP-PASTA domains.

#### PBP2x recruitment to mid-cell depends on its interaction with StkP

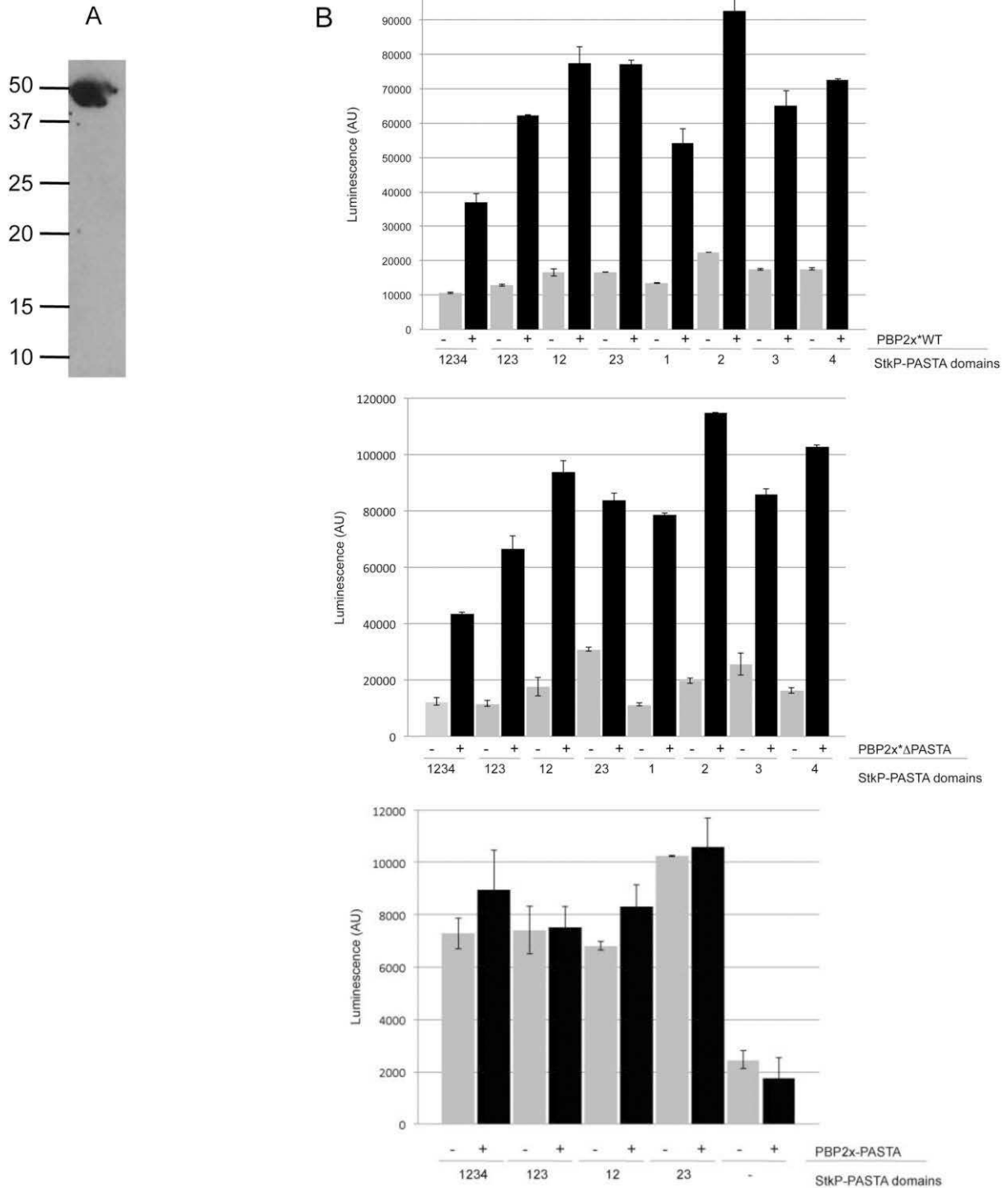
We showed that PBP2x and StkP colocalize to the division site over the cell cycle of the R6 wild-type strain of *S. pneumoniae* and that they interact through their extracellular regions. To investigate whether this interaction is required for PBP2x localization, we expressed a GFP–PBP2x fusion protein in various *stkP* mutant strains, which display phenotypes resulting from an impaired or incomplete division process (Fleurie *et al.*, 2012) (Fig. 6). Interestingly, GFP–PBP2x localized to the division site in the  $\Delta$ *stkP* and  $\Delta$ *KD* strains whereas in the  $\Delta$ *PASTA* mutant, it displayed a diffuse membrane localization pattern with very little enrichment at the division site (Fig. 6A). In the  $\Delta$ *PASTA* mutant strain population, we distinguished long (2–10  $\mu$ m) and short (0.8–2  $\mu$ m) cells, representing 70% and 30% of the population respectively

( $n = 252$ ). In the longer cells, PBP2x enrichment at the septum is reduced by a factor 2.6 when compared with the wild-type strain (Fig. 6B), and by a factor 1.6 in the shorter cells. These data suggest that the septal recruitment of PBP2x is impaired in the absence of the StkP-PASTA domains. To exclude the possibility that the diffuse localization of GFP–PBP2x could be a consequence of the severe shape defect of the  $\Delta$ *PASTA* strain, we analysed the localization of GFP–PBP2x in the *stkP-K42M* mutant strain, which expresses an inactive kinase and displays an elongated cell phenotype comparable with the  $\Delta$ *PASTA* mutant strain (Fleurie *et al.*, 2012). In this strain, GFP–PBP2x displays a ladder localization pattern (Fig. 6A), likely corresponding to the immature septa observed previously in these giant cells (Fleurie *et al.*, 2012). Altogether, these data indicate that the StkP-PASTA domains are specifically required *in vivo* for PBP2x localization at the septum and they further support our model of an interaction between the StkP-PASTA domains and PBP2x in the membrane of *S. pneumoniae*.

#### Soluble cell wall fragments binding to StkP inhibits the interaction with PBP2x

The ability of StkP to bind PG was tested in a pull-down assay using purified StkP-PASTA domains. Interestingly, the complete set of PASTA-1234 domains, as well as the combinations PASTA-123 and PASTA-12 and the individual PASTA-4 domain were efficiently pulled-down by purified PG sacculi of *S. pneumoniae* (Fig. 7A). In contrast, PASTA-1, PASTA-2 and PASTA-3 domains were not found in the pulled-down fractions, indicating that these individual domains do not interact strongly with the pneumococcal cell wall (Fig. 7A).

The observation that StkP interacts with PG led us to ask if this interaction would impact StkP binding to PBP2x. To test this hypothesis, we performed solid-phase assays, which revealed that in presence of soluble cell wall fragments, binding of StkP-PASTA domains to PBP2xWT and PBP2x $\Delta$ *PASTA* is inhibited by 84% and 94% respectively (Fig. 7B). The addition of mutanolysin and buffer used



**Fig. 5.** Purified StkP-PASTA domains and extracellular region of PBP2x form a complex.

**A.** Far Western blot. StkP-PASTA-1234 domains was subjected to SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Soluble extracellular region of PBP2x was used as a probe and bound PBP2x was then immunodetected using an anti-PBP2x serum.

**B.** Solid-phase assays. The StkP-PASTA domains (1 µg) were coated on 96-well plate. Buffer (grey bars) or purified PBP2x proteins (black bars) were added into wells. After extensive washes, bound PBP2x proteins were immunodetected using anti-PBP2x rabbit serum and horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG. Chemiluminescence was measured after extensive washes and expressed as arbitrary units. Each assay was performed three times in duplicate wells. A representative experiment of the interaction of each PBP2x variant with StkP-PASTA domains is shown. (Upper panel) extracellular region of PBP2x (PBP2xWT). (Middle panel) extracellular region of PBP2x deleted from the PASTA-N and PASTA-C domains (2xΔPASTA). (Lower panel) PBP2x PASTA domains expressed in tandem (PBP2x-PASTA).

**Table 1.** Apparent  $K_D$  values of the StkP–PBP2x complex measured by thermophoresis.

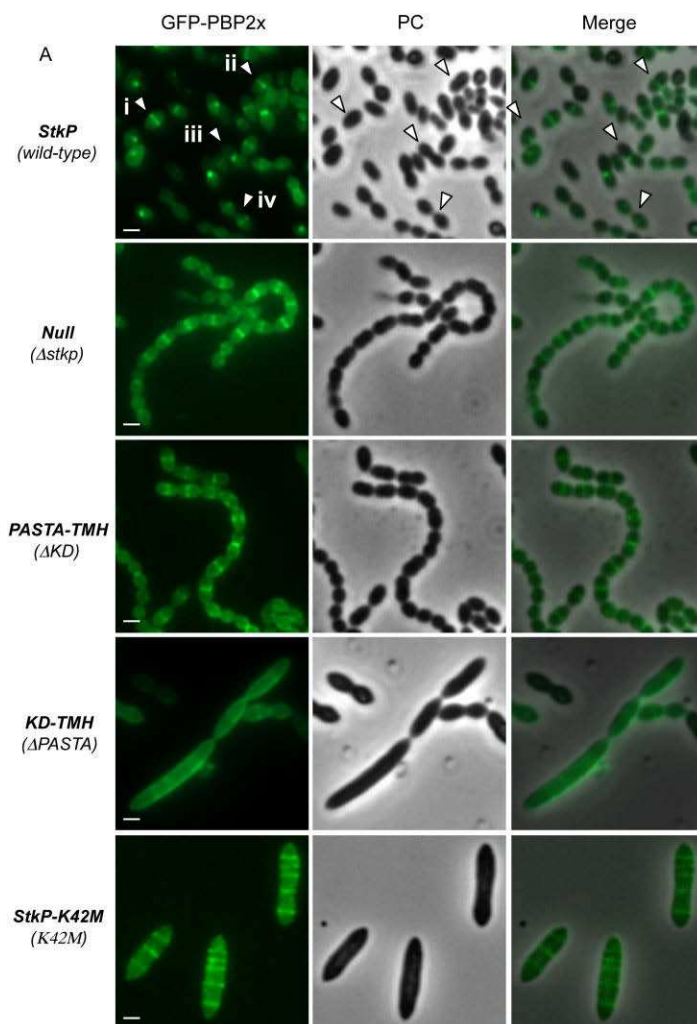
Ligand	Apparent $K_D$ ( $\mu\text{M}$ )
PASTA-1234	$24.5 \pm 0.9$
PASTA-1	$11.7 \pm 0.6$
PASTA-2	$73.0 \pm 4.0$
PASTA-3	$15.6 \pm 0.6$
PASTA-4	$65.0 \pm 3.0$

for cell wall purification had negligible effect on the StkP–PBP2x complex (Fig. 7B, lanes C1 and C2) and a dose-dependence effect was observed (Fig. S4). These data indicate that soluble cell wall fragments inhibit the

interaction between the StkP–PASTA domains and the extracellular region of PBP2x.

*The hydrolytic activity of PBP2x is not modified in vitro in the presence of StkP*

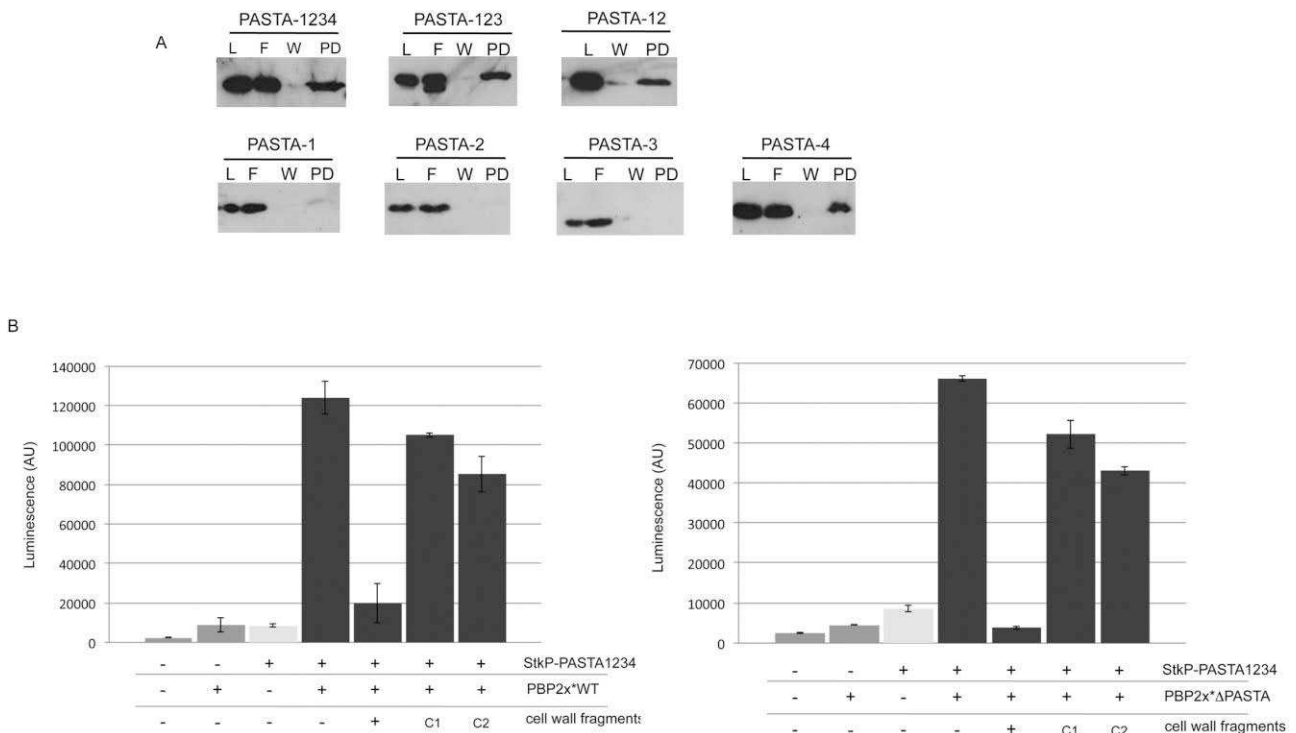
In order to determine whether StkP modifies the capacity of PBP2x to recognize its substrates *in vitro*, we evaluated the ability of PBP2x to bind  $\beta$ -lactams and to hydrolyse the pseudo substrate *N*-benzoyl-D-alanylmercaptoacetic acid (S2d), a thioester analogue of the stem wall peptide (Zhao *et al.*, 1997) (Figs S5 and S6 and Table S2). The capacity of PBP2x to bind Bocillin-FL, a penicillin fluorophore-conjugate, was not modified by the presence of StkP (Fig. S6). Similarly, we could not detect any modification

**Fig. 6.** Localization of PBP2x in *stkP* mutant strains.

A. The GFP–PBP2x encoding gene was inserted into the chromosome of the various *stkP* mutant strains at the *bgaA* ectopic site. The merge pictures show the overlay of GFP–PBP2x and phase-contrast (PC) views. The white arrowheads point at the cell cycle stages (i to iv) shown in Fig. 2A. Scale bars, 1  $\mu\text{m}$ .

B. Distribution of the GFP–PBP2x fluorescence signal in the wild-type strain and the KD-TMH mutant ( $\Delta\text{PASTA}$ ).

	WT	long $\Delta\text{PASTA}$ ( $>2 \mu\text{m}$ )	short $\Delta\text{PASTA}$ ( $<2 \mu\text{m}$ )
membrane	37 %	45 %	58 %
septum	63 %	55 %	42 %
septum - membrane	26	10	16



**Fig. 7.** Interaction of the StkP-PASTA domains with the pneumococcal cell wall.

**A.** Pull-down of the different combinations of PASTA domains with pneumococcal cell wall. The load (L) protein was mixed with the insoluble cell wall preparation and compared with the flow-through (F) fraction. After extensive wash (W), protein bound to the cell wall pellet was eluted with Laemmli buffer at 100°C for 10 min (PD). The protein samples were analysed by Western blot using the anti-StkP-PASTA rabbit serum.

**B.** Solid-phase assay. Interaction of the StkP-PASTA1234 protein with the extracellular region of PBP2x (PBP2x\*WT) and PBP2x deleted from the PASTA-N and PASTA-C domains (PBP2x\*ΔPASTA), in absence or presence of 10 μl (450 μg) of cell wall fragments. Controls C1: mutanolysin; C2: buffer. Negative controls: gelatin was coated as an irrelevant protein (dark grey bars) and buffer was added in place of the purified PBP2x proteins (light grey bars).

of S2d hydrolysis by PBP2x in the presence of the kinase (Fig. S5 and Table S2). Although we were not able to show *in vitro* a direct impact of the PBP2x–StkP interaction on the hydrolytic activity of PBP2x, the modulation of PBP2x activity could still happen in an *in vivo* context. Better chances to detect modulations of the PBP2x activity by StkP *in vitro* could be obtained using the pneumococcal physiological substrate Lipid II carrying an isoglutamine at position 3 of the peptidic chain. However, such substrate is so far not available.

## Discussion

The demonstration that StkP phosphorylates FtsZ, DivIVA and GlmM (Giefing *et al.*, 2010; Novakova *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010) has connected StkP to the process of cell division. Later on, the construction of *stkP* mutants displaying morphological aberrations (Beilharz *et al.*, 2012; Fleurie *et al.*, 2012) has involved this kinase in the regulation of PG synthesis. To investigate StkP regulatory functions, we have initiated a study of the StkP interaction network with cell division and PG synthesis putative part-

ners. In this work, we demonstrate that PBP2x belongs to this network as it interacts with StkP *in vitro* and in pneumococcal membrane extracts.

### Assembly of the StkP–PBP2x complex and role of the PASTA domains

We have demonstrated that StkP and PBP2x form a complex in the membrane extracts of *S. pneumoniae*, and that the PASTA domains of StkP interact directly with the extracellular region of PBP2x. We have shown that the binding region in PBP2x encompasses the N-terminal extracellular domain of unknown function and the transpeptidase domain but does not require the two PBP2x-PASTA domains. In PBP2x and StkP, the PASTA domains share between 10% and 20% identity. The secondary structure elements seem to be conserved between the different domains since all the StkP-PASTA domains are predicted to possess the same one helix and three beta-strands as observed in the structure of the PBP2x-PASTA domains (PDB accession 1QME, Gordon *et al.*, 2000). Despite a predicted conserved three-dimensional fold,

comparable function of PASTA domains does not seem to be shared by StkP and PBP2x. Our data indicate that PASTA domains of StkP are involved in cell wall and PBP2x binding whereas in PBP2x, none of the PASTA domains is involved in interaction with StkP or PG. However, since no pneumococcal mutant strain expressing PBP2x deleted from the PASTA-N and PASTA-C domains could be obtained (data not shown), we propose that the PBP2x PASTA domains are involved in still to be identified essential functions.

The structural analysis of PBP2x had previously shown that a  $\beta$ -lactam molecule was packed between the transpeptidase domain and the PASTA-N domain (Gordon *et al.*, 2000). Based on this observation, it has been proposed that the StkP-PASTA domains would act as peptidoglycan receptors. In favour of this hypothesis, we present evidence that the four StkP-PASTA domains, as well as the PASTA-12 and PASTA-123 combinations and the individual PASTA-4 domain, bind to pneumococcal cell wall fragments. Binding to mature peptidoglycan or its precursors had been reported for *B. subtilis* PkrC and *M. tuberculosis* PknB (Shah *et al.*, 2008; Maestro *et al.*, 2011; Mir *et al.*, 2011; Squeglia *et al.*, 2011). Our experimental data are in accordance with the modelling studies performed with *S. aureus* PkrC, which proposed that muropeptide binding sites take place at the PASTA domain interface and at the surface of the last PASTA domain (Paracuellos *et al.*, 2010). The binding of the STKP-PASTA domains to peptidoglycan fragments has been proposed to favour dimerization of these extracellular domains, an event that would trigger a signal leading to the activation and autophosphorylation of the cytoplasmic kinase domain (reviewed in Pereira *et al.*, 2011). In support of this idea, a link between PrkC activation and peptidoglycan fragment binding has been described during sporulation in *B. subtilis* (Shah *et al.*, 2008).

Using thermophoresis experiments, we have estimated the dissociation constant of the StkP–PBP2x complex in solution to be in the micromolar range. This weak apparent affinity could fit a model in which assembly of the StkP–PBP2x complex would be tuned during the cell cycle by components like PG or teichoic acids fragments since our data indicate that the presence of soluble cell wall components destabilizes the StkP–PBP2x complex. Since PBP2x is not able to bind pneumococcal cell wall (data not shown), destabilization of the StkP–PBP2x complex most likely arises from StkP binding to cell wall components. One possibility could be that the StkP–cell wall interface overlaps with the StkP–PBP2x interface, constraining the two StkP ligands to compete for the same binding site. Alternatively, cell wall binding to StkP could induce a conformational change that, in turn, would destabilize the StkP–PBP2x complex.

### Functional role of the StkP–PBP2x interaction

We have shown that StkP and PBP2x colocalize at the division site, both displaying a localization pattern lagging behind the one of FtsZ. In addition, we have demonstrated that StkP and PBP2x interact directly. Altogether, our data indicate that StkP and PBP2x belong to the same membrane complex involved in septal PG synthesis. One major challenge will be now to determine the function of the StkP–PBP2x interaction.

A reasonable hypothesis is that the complex is meant to localize both StkP and PBP2x at the division site. In agreement with the hypothesis that StkP facilitates PBP2x anchoring at the division site, we have shown that in the absence of the extracellular PASTA domains of StkP ( $\Delta$ PASTA), PBP2x displays a diffuse membrane localization pattern. Noteworthy, we have observed that in the  $\Delta$ PASTA mutant strain, the more elongated the cells are, the lesser PBP2x is present at the septum, suggesting that impaired pneumococcal cells morphology is associated with PBP2x mislocalization. In the absence of the PASTA domains, Fleurie *et al.* had previously observed that the KD-TMH variant also displays diffuse membrane localization (Fleurie *et al.*, 2012). Altogether, these studies suggest both that the StkP-PASTA domains are required to localize StkP and PBP2x at the division site, and that proper localization of these proteins is necessary to the division process. Impaired localization of the kinase domain might cause impaired phosphorylation of StkP substrates (Fleurie *et al.*, 2012). Even though PBP2x is not phosphorylated by StkP (data not shown), it remained possible that mislocalization of PBP2x in the  $\Delta$ PASTA mutant strain is an indirect consequence of impaired kinase activity. In order to investigate this, we have analysed the localization of GFP–PBP2x in the *stkP-K42M* mutant strain, which displays the same elongated cell phenotype than the  $\Delta$ PASTA mutant strain and expresses an inactive StkP kinase (Fleurie *et al.*, 2012). The septal localization of GFP–PBP2x in this strain confirms that the StkP-PASTA domains are specifically required *in vivo* for PBP2x localization at the septum. It also indicates that the elongated phenotype of the *stkP-K42M* mutant strain is not due to PBP2x mislocalization but would rather be a consequence of impaired phosphorylation of StkP substrates. Altogether, these results show that both the PASTA domains and the kinase activity of StkP are required for proper septal peptidoglycan synthesis.

In conclusion, our work suggests that the PBP2x–StkP interaction is a structural requirement for the assembly of a functional division machinery. Studies are ongoing to further decipher the function of the StkP–PBP2x complex and the molecular determinants of the complex formation and regulation.

**Table 2.** Strains and plasmids used in this study.

Strains, plasmids	Relevant genotype or description	Reference
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5a	<i>F</i> <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> $\Phi$ 80 <i>dlaCZ</i> $\Delta$ M15	Grant <i>et al.</i> (1990)
BL21(DE3)	$\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub> m<sub>K</sub></i> ), $\lambda$ - <i>F ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub> m<sub>B</sub></i> ) $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ])	Studier and Moffatt (1986)
<b><i>S. pneumoniae</i></b>		
R6	<i>S. pneumoniae</i> R36A derivative	A. Tomasz
$\Delta$ <i>stkP</i>	$\Delta$ <i>stkP</i> ; <i>Str</i> <sup>R</sup>	Fleurie <i>et al.</i> (2012)
<i>stkP</i> -KD-TMH	$\Delta$ <i>stkP</i> -kinase domain; <i>Str</i> <sup>R</sup>	Fleurie <i>et al.</i> (2012)
<i>stkP</i> -PASTA-TMH	$\Delta$ <i>stkP</i> -extracellular domain; <i>Str</i> <sup>R</sup>	Fleurie <i>et al.</i> (2012)
<i>stkP</i> -K42M	<i>stkP</i> (K42M); <i>Str</i> <sup>R</sup>	Fleurie <i>et al.</i> (2012)
<i>gfp</i> - <i>pbp2x</i>	R6; <i>bgaA</i> :: <i>P<sub>Zn</sub></i> - <i>gfp</i> - <i>pbp2x</i> , <i>Tet</i> <sup>R</sup>	This study
<i>gfp</i> - <i>ftsZ</i>	R6; <i>bgaA</i> :: <i>P<sub>Zn</sub></i> - <i>gfp</i> - <i>ftsZ</i> , <i>Tet</i> <sup>R</sup>	This study
<i>gfp</i> - <i>stkP</i>	R800 <i>rpsL1</i> ; <i>Str</i> <sup>R</sup> ; $\Delta$ <i>phpP</i> - <i>stkP</i> :: <i>Janus</i> ; <i>Kan</i> <sup>R</sup> , <i>Str</i> <sup>S</sup> , <i>gfp</i> - <i>stkP</i> ; <i>Str</i> <sup>R</sup>	Fleurie <i>et al.</i> (2012)
<i>gfp</i> - <i>stkP</i> -KD-TMH	R800 <i>rpsL1</i> ; <i>Str</i> <sup>R</sup> ; $\Delta$ <i>phpP</i> - <i>stkP</i> :: <i>Janus</i> ; <i>Kan</i> <sup>R</sup> , <i>Str</i> <sup>S</sup> , <i>gfp</i> - <i>stkP</i> -kinase domain; <i>Str</i> <sup>R</sup>	Fleurie <i>et al.</i> (2012)
<i>gfp</i> - <i>stkP</i> -PASTA-TMH	R800 <i>rpsL1</i> ; <i>Str</i> <sup>R</sup> ; $\Delta$ <i>phpP</i> - <i>stkP</i> :: <i>Janus</i> ; <i>Kan</i> <sup>R</sup> , <i>Str</i> <sup>S</sup> , <i>gfp</i> - <i>stkP</i> -extracellular domain; <i>Str</i> <sup>R</sup>	Fleurie <i>et al.</i> (2012)
<i>gfp</i> - <i>stkP</i> -K42M	R800 <i>rpsL1</i> ; <i>Str</i> <sup>R</sup> ; $\Delta$ <i>phpP</i> - <i>stkP</i> :: <i>Janus</i> ; <i>Kan</i> <sup>R</sup> , <i>Str</i> <sup>S</sup> , <i>gfp</i> - <i>stkP</i> (K42M); <i>Str</i> <sup>R</sup>	Fleurie <i>et al.</i> (2012)
<b>Plasmids</b>		
pETDuet-StkP	Encoding full-length StkP, from Met1 to Pro659, Amp <sup>R</sup>	This study
pETDuet-his-PBP2FL	Encoding full-length PBP2x, from Met1 to Asp750, Amp <sup>R</sup>	This study
pETDuet-his-PBP2xFL-StkP	Encoding StkP, from Met1 to Pro659 and PBP2xFL from Met1 to Asp750, Amp <sup>R</sup>	This study
pGEX-PBP2x	Encoding PBP2x extracellular region, from Gly49 to Asp750, Amp <sup>R</sup>	Pares <i>et al.</i> (1996)
pGEX-PBP2x $\Delta$ PASTA	Encoding PBP2x extracellular region, Gly49 to Ser640, Amp <sup>R</sup>	This study
pETDuet-PBP2x-PASTA	Encoding PBP2x extracellular region, from Ser640 to Asp750, Amp <sup>R</sup>	This study
pETDuet-StkP-PASTA1234	Encoding StkP extracellular region, from Arg365 to Pro659, Amp <sup>R</sup>	This study
pETphos-StkP-PASTA123	Encoding StkP extracellular region, from Arg365 to Lys577, Amp <sup>R</sup>	This study
pETphos-StkP-PASTA12	Encoding StkP extracellular region, from Arg365 to Lys505, Amp <sup>R</sup>	This study
pETphos-StkP-PASTA23	Encoding StkP extracellular region, from Ser433 to Lys577, Amp <sup>R</sup>	This study
pETphos-StkP-PASTA1	Encoding StkP extracellular region, from Arg365 to Ser433, Amp <sup>R</sup>	This study
pETphos-StkP-PASTA2	Encoding StkP extracellular region, from Ser433 to Lys505, Amp <sup>R</sup>	This study
pETphos-StkP-PASTA3	Encoding StkP extracellular region, from Lys505 to Lys577, Amp <sup>R</sup>	This study
pETphos-StkP-PASTA4	Encoding StkP extracellular region, from Lys577 to Pro659, Amp <sup>R</sup>	This study
pCM39	<i>bgaA</i> :: <i>P<sub>Zn</sub></i> - <i>gfp</i> - <i>pbp2x</i> , <i>Tet</i> <sup>R</sup>	This study
pCM79	<i>bgaA</i> :: <i>P<sub>Zn</sub></i> - <i>gfp</i> - <i>ftsZ</i> , <i>Tet</i> <sup>R</sup>	This study

## Experimental procedures

### Bacterial strains and plasmids

Strains and plasmids used in this study are listed in Table 2 and the oligonucleotides in Table S1.

### Growth conditions, media and bacterial transformation

*Streptococcus pneumoniae* strains were grown at 30°C or 37°C in CY medium (Shockman *et al.*, 1967) or in Todd Hewitt medium (TH, BD Sciences). Blood agar plates were made from Columbia agar containing 4% defibrinated horse blood (Difco). Appropriate antibiotics were added to media: tetracycline 2.5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, streptomycin 200  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. For transformation of *S. pneumoniae*, 500 ng of plasmid DNA was added to competent cells (diluted in 1/10 of CY medium containing 0.015% of albumin) followed by a phenotypic expression period of 30 min at 30°C, 2 h at 37°C and overnight growth on Columbia blood agar plates containing appropriate antibiotic.

### Constructions of overexpressing plasmids

The amplification of genes was performed using the chromosomal DNA of the *S. pneumoniae* R6 strain. The genes encod-

ing StkP (residues 2–659) and FL-PBP2x (residues 2–750) were cloned into pETDuet bi-cistronic plasmid (Novagen). *stkP* was cloned in the MCS2 and encodes a protein lacking any tag, while cloning *pbp2x* into the MCS1 allowed the expression of FL-PBP2x fused to the N-terminal end to a poly-histidine tag. Each gene was cloned in separate plasmids or in the same plasmid, leading to independent or combined protein production respectively. The DNA fragment encoding the PASTA-N and PASTA-C domains of PBP2x (residues 639–750) was cloned in the MCS1 of the pETDuet vector leading to a poly-histidine tag fusion at the N-terminal end. DNA sequences encoding the various combinations of the StkP-PASTA domains (Table 2) were fused to an N-terminal poly-histidine tag in the pETPhos vector. DNA encoding the StkP PASTA-1234 (residues 365–659) was also cloned in the MCS1 of pETDuet vector leading to an N-terminal end poly-histidine tag fusion.

### Site-directed mutagenesis

Mutations were introduced by PCR-based site-directed mutagenesis (Stratagene QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit). Mutations and error-free amplification were verified by DNA sequencing (Cogenics) and transformed into the *E. coli* BL21(DE3) strain for protein expres-

sion. This procedure was used to delete the PASTA-N and PASTA-C domains of PBP2x using the pGEX-PBP2x construct as template.

#### Constructions of pJWV25-based plasmids

DNA amplification was performed using the chromosomal DNA of the *S. pneumoniae* R6 strain. The genes encoding FL-PBP2x (residues 2–750) and FtsZ (residues 1–419) were fused at the C-terminal end of the *gfp+* by modification of the pJWV25 vector (Eberhardt *et al.*, 2009). Pneumococcal strains expressing GFP–PBP2x and GFP–FtsZ were obtained by a double-crossover recombination event between the chromosomal *bgaA* gene of strain R6 and the *bgaA* region in the pJWV25 derived vectors (pCM39 and pCM79). In these plasmids, the expression of GFP–PBP2x and GFP–FtsZ is under the control of the zinc-inducible PczcD promoter. A concentration of 0.15 mM ZnCl<sub>2</sub> was added to liquid medium and blood agar plates to induce PczcD.

#### Immunoprecipitation of StkP and PBP2x complexes

Cultures (2 l) of R6 and mutant strains expressing StkP variants were grown exponentially to OD<sub>600</sub> of 0.5. Cells were collected by centrifugation (4355 *g* for 15 min at 4°C) and suspended in 40 ml of lysis buffer: 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, proteases inhibitors (Complete, Roche), 100 µg ml<sup>-1</sup> lysozyme, 160 U ml<sup>-1</sup> mutanolysin (Sigma), 0.1 mg ml<sup>-1</sup> DNase, 0.025 mg ml<sup>-1</sup> RNase. The cell suspension was incubated for 1 h 30 min at 37°C with gentle shaking before mechanical cell lysis by sonication (2 min : 2 s ON and 8 s OFF pulses at 4°C) using a Sonicator 3000 (Misonix). Cell debris were pelleted by centrifugation (4355 *g* for 15 min at 4°C) and the supernatant was subjected to ultracentrifugation (257 320 *g* for 1 h at 4°C) to pellet membrane fraction. The pellet was suspended in 8 ml of buffer containing 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl and conserved in aliquots at –80°C.

Membrane proteins (500 µl) were solubilized by 50 µl of buffer containing 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2% (vol/vol) Triton X-100 for 16 h at 4°C with gentle shaking. Debris were pelleted by ultracentrifugation (135 240 *g* for 30 min at 4°C) and the supernatant containing solubilized membrane proteins was collected and conserved in aliquots at –20°C. For each immunoprecipitation (IP) experiment, 50 µl of solubilized membrane proteins were diluted in 50 µl of IP buffer [50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2% (vol/vol) Triton X-100] before adding 20 µl of anti-StkP-PASTA domains, anti-PBP2x sera or PBS and incubated for 5 h at 4°C with gentle shaking. A volume of 50 µl of protein A Sepharose (GE Healthcare) was added and incubated for 16 h at 4°C with gentle shaking. The resin was washed three times with IP buffer before elution of the retained proteins with 100 µl of denaturing Laemmli buffer and boiling for 10 min. Samples were separated by 12.5% SDS/PAGE and subjected to Western blotting using anti-StkP-PASTA domains and anti-PBP2x sera. Incubation times of 1 h were successively performed with the primary polyclonal antibodies and Clean-Blot™ IP Detection Reagent (Thermo Scientific, diluted 1:400) before detection with a chemiluminescent substrate (Pierce).

#### Protein purification

One litre culture of *E. coli* BL21/DE3 cells in Terrific Broth (BD Biosciences) was incubated at 37°C until exponential phase. Protein expression was induced with 0.5 mM IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) at 37°C for 3 h (condition for His-tagged StkP-PASTA variants production) or overnight at 15°C (condition for StkP and all PBP2x constructs). Cells were harvested by centrifugation, suspended in buffer A, B or C (see below) containing a protease inhibitor cocktail (Complete with or without EDTA, Roche) and lysed by sonication (2 min : 2 s ON and 8 s OFF pulses at 4°C) using a Sonicator 3000 (Misonix). The lysate was clarified by centrifugation for 20 min at 39 191 *g* at 4°C and applied to the appropriate chromatography column.

Purification of His-tagged soluble proteins was performed with buffer A (50 mM Tris, pH 8.0, 200 mM NaCl, 20 mM imidazole) using a HisTrap™ HP column (GE Healthcare). After load and extensive wash, protein elution was performed using a linear gradient of 20–500 mM imidazole in buffer A over 20 column volumes. The eluted protein was dialysed to remove imidazole and was used for protein–protein interactions assays and for cell wall pull-down experiments.

StkP and His-PBP2xFL were either expressed in distinct strains or coexpressed in a single strain. Purification was performed using the same protocol. Cells were suspended in buffer A and sonicated. CHAPS was added to the lysate to 1% final concentration and the mixture was incubated for 16 h at 4°C under gentle shaking. Cell debris were removed by ultracentrifugation (257 320 *g* for 1 h at 4°C). The supernatant, containing solubilized membrane StkP and His-tagged PBP2xFL proteins was loaded onto a HisTrap™ HP column (GE Healthcare) equilibrated with buffer B (50 mM Tris, pH 8.0, 200 mM NaCl, 20 mM imidazole, 0.25% CHAPS). After extensive wash, protein elution was performed using a linear gradient of 20–500 mM imidazole in buffer B over 20 column volumes. Samples (load, wash and eluted fractions) were separated by 12.5% SDS/PAGE and subjected to Western blotting using anti-StkP-PASTA domains and anti-PBP2x sera. Incubation times of 1 h were successively performed with the primary polyclonal antibodies and anti-rabbit HRP conjugate (Sigma, diluted 1:10 000) before detection with a chemiluminescent substrate (Pierce).

The extracellular regions of PBP2x and the variant deleted from the PASTA-N and PASTA-C domains (PBP2xΔPASTA) were fused to the GST protein. Purification was performed in buffer C (50 mM Tris, pH 8.0, 200 mM NaCl) using a Glutathione Sepharose column (GE Healthcare). After load and extensive wash, the resin was incubated with thrombin for 1 h at room temperature to cleave the GST and release PBP2xWT or PBP2xΔPASTA in the flow-through.

#### Microscopy techniques

For GFP fluorescence observation, cells were grown in CY medium supplemented with 0.15 mM ZnCl<sub>2</sub> until OD<sub>600</sub> = 0.3–0.4, resuspended in fresh CY medium and transferred to microscope slides. For immunofluorescence microscopy, cells were grown in CY medium until OD<sub>600</sub> of 0.3–0.4 and fixed for 2 h on ice in 4% (wt/vol) paraformaldehyde. After three washes in PBS, cells were resuspended in GTE buffer

(50 mM glucose, 10 mM EDTA, 20 mM Tris pH 7.5) and transferred onto poly L-lysine-coated Poly Prep™ slides (Sigma). The slides were incubated in PBS–0.2% Triton X-100 (vol/vol) for 5 min, air dried, incubated in methanol at –20°C for 5 min and air dried again. After rehydration with PBS, the slides were blocked for 30 min at room temperature with PBS–0.2% Triton X-100–3% (wt/vol) BSA (PBS–Triton–BSA). The slides were incubated for 1 h at room temperature with 1:200 and 1:50 dilutions of rabbit anti-StkP-PASTA domains or anti-KD-StkP antibodies, respectively, in PBS–Triton–BSA. The slides were washed with PBS–Triton–BSA and incubated for 1 h with a 1:200 dilution of Cy3-coupled anti-rabbit IgG in PBS–Triton–BSA. Following washing, slides were mounted with Moviol. Slides were observed using an Olympus BX61 optical microscope equipped with a UPFLN 100× O-2PH/1.3 objective and a QImaging Retiga-SRV 1394 cooled charge-coupled device camera. Image acquisition was performed using the Volocity software package and processed with Adobe Photoshop 6.0.

#### Isolation of pneumococcal cell wall

Cell wall purification from *S. pneumoniae* R6 was adapted according to Bui *et al.* (2012). Briefly, a 2 l culture in TH was incubated at 30°C until OD<sub>600</sub> of 0.5. Cells were harvested by centrifugation for 10 min at 4°C at 7500 *g* and resuspended in 40 ml of ice-cold 50 mM Tris pH 7.0. The cell suspension was poured dropwise into 150 ml of boiling 5% sodium dodecyl sulphate (SDS) solution and boiled for another 30 min. Cell debris were pelleted by centrifugation at 20°C for 20 min at 48 384 *g*. The pellet was washed twice with 25 ml of 1 M NaCl at 20°C for 30 min at 48 384 *g* and repeatedly with water until it was free of SDS (Hayashi, 1975). The pellet was resuspended in 20 ml of buffer containing 100 mM Tris pH 7.5, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, DNase A (10 µg ml<sup>-1</sup>) and RNase I (50 µg ml<sup>-1</sup>). The incubation was performed for 2 h at 37°C with gentle shaking before addition of 10 mM CaCl<sub>2</sub> (final concentration) and trypsin (100 µg ml<sup>-1</sup>). The incubation was pursued for 18 h at 37°C with gentle shaking. Proteases were inactivated with addition of SDS (1% final concentration) and incubation for 15 min at 80°C. The cell wall preparation was recovered by ultracentrifugation for 30 min at 257 320 *g* at 25°C, resuspended in 20 ml of 8 M LiCl, and incubated for 15 min at 37°C. After another ultracentrifugation step, the pellet was resuspended in 25 ml of 10 mM EDTA pH 7.0 and incubated at 37°C for 1 h. The cell wall was washed with water before being resuspended in 2 ml of water and conserved at 4°C. Soluble cell wall fragments were prepared by incubation of 15 mg of cell wall with 1.5·10<sup>6</sup> U of mutanolysin (Sigma) in 330 µl of PBS. The incubation was carried out for 16 h at 37°C until complete solubilization of the cell wall preparation. The enzyme was denatured by boiling the preparation for 10 min. The cell wall fragments were finally recovered in the supernatant fraction after centrifugation (10 min at 10 500 *g*).

#### Cell wall binding

Purified StkP variant proteins (10 µg ml<sup>-1</sup>) were incubated with purified *S. pneumoniae* cell wall (7 mg) in 50 µl of 50 mM

Tris pH 8.0, 100 mM NaCl for 16 h at 4°C. After centrifugation (5 min at 5000 *g*), the supernatant was removed (flow-through or unbound fraction) and the cell wall pellet was washed three times and resuspended in 50 µl Laemmli buffer. After an incubation at 100°C for 10 min and a centrifugation step (3 min at 5000 *g*), the supernatant fraction, corresponding to the bound protein fraction, was recovered from the cell wall pellet. Unbound, wash and bound fractions were analysed by SDS-PAGE subjected to Western blotting using anti-StkP-PASTA domains serum. Incubation times of 1 h were successively performed with the primary polyclonal antibody and secondary anti-IgG rabbit HRP-conjugate (Sigma, diluted 1:10 000) before detection with a chemiluminescent substrate (Pierce).

#### In vitro interaction by solid-phase assay

White 96-well microtitre plates (Greiner Bio One) were coated with 1 µg of StkP-PASTA domains or gelatin as a control in 100 µl PBS at 4°C overnight. Saturation was performed by adding 100 µl of PBS–0.2% gelatin per well for 1 h at room temperature. The recombinant PBP2x variants were added in each well (50 pmoles) and the mixture was incubated for 2 h at room temperature. Five washes were performed using 200 µl of PBS. Bound PBP2x proteins were detected by adding 100 µl of rabbit anti-PBP2x antibody (1:1000 dilution) in PBS–0.02% gelatin for 1 h at room temperature. After five washes with PBS, goat anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase diluted 1:15 000 in PBS–0.02% gelatin was added for 1 h at room temperature. Five washes with 100 µl PBS were performed. ECL solution (Pierce) (100 µl) was added to each well and chemiluminescence was measured using a multiwell luminescence reader (Fluostar Optima; BMG).

#### Microscale thermophoretic analysis

Microscale thermophoresis is the measurement of the movement of molecules along a temperature gradient resulting from an infrared laser irradiation of an aqueous solution (Lippok *et al.*, 2012). Monitoring the changes in diffusion occurring in the increased temperature gradient enables the estimation of the concentrations of free molecules versus complex ratios and consequently the derivation of the dissociation constant. Binding experiments were carried out with Monolith NT.Label Free (Nano Temper Technologies GMBH). In the Monolith NT.LabelFree instrument, an infrared laser (IR laser) beam couples into the path of light (i.e. fluorescence excitation and emission) with a dichroic mirror and is focused into the sample fluid through the same optical element used for fluorescence imaging. The IR laser is absorbed by the aqueous solution in the capillary and locally heats the sample. Thermophoresis of PBP2xWT in the presence of varying concentrations of StkP-PASTA domains was analysed for 30 s. Briefly, 4 µl of sample containing 100 nM of PBP2xWT and increasing concentrations of StkP-PASTA domains (from 3.05 nM to 100 µM) were loaded on standard treated silicon capillaries and thermophoresis in 280 nm was measured. Each measurement was taken three times. Experiments were carried out at room temperature in Phosphate-Buffered Saline 1X. Analysis was performed with the Monolith software. Affinity  $K_D$  was quantified



by analysing the change in normalized fluorescence ( $F_{\text{norm}} = \text{fluorescence after thermophoresis}/\text{initial fluorescence}$ ) as a function of the concentration of the titrated StkP fragment. The fraction of PBP2x bound ( $\Delta F_{\text{norm}}/\text{amplitude}$ ) was plotted against the concentration of StkP.

#### Measurements of PBP2x enzymatic activities

Various molar ratios of PBP2x\*WT and StkP-PASTA domains were incubated for 25 min at RT. Bocillin-FL, a penicillin fluorophore-conjugate (Molecular probes) was added to the protein mix and incubation was pursued for 35 min at RT. Proteins were separated by 12.5% SDS-PAGE and labelled PBP2x\*WT was visualized in the gel using a Typhoon 9210 gel scanner (Amersham Biosciences).

The ability of PBP2x\*WT to hydrolyse the pseudo substrate *N*-benzoyl-D-alanylmercaptoacetic acid (S2d), which is a thioester analogue of the stem wall peptide, was explored in the presence or the absence of the StkP-PASTA domains. Hydrolysis of S2d was followed by monitoring the amount of thiol group released using the method described by Zhao *et al.*, (1997). Concentrations of 2  $\mu\text{M}$  of PBP2x\*WT and 4  $\mu\text{M}$  of StkP-PASTA were used.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from the CEA and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV8-005-01 and ANR-12-BSV3-0008-04). M.J. was funded by the Labex GRAL (Alliance Grenobloise pour la Biologie Structurale et Cellulaire Intégrées). A.F. was funded by PhD grant from the Rhône-Alpes région, Cluster Infectiologie. We thank Dr W. Vollmer for providing the pJWV25 plasmid. We thank F-X. Ogi from NanoTemper Technologies GmbH for providing access to the Monolith NT.LabelFree.

#### References

- Beilharz, K., Nováková, L., Fadda, D., Branny, P., Massidda, O., and Veening, J.W. (2012) Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 905–913.
- Beltramini, A.M., Mukhopadhyay, C.D., and Pancholi, V. (2009) Modulation of cell wall structure and antimicrobial susceptibility by a *Staphylococcus aureus* eukaryote-like serine/threonine kinase and phosphatase. *Infect Immun* **77**: 1406–1416.
- Bui, N.K., Eberhardt, A., Vollmer, D., Kern, T., Bougault, C., Tomasz, A., *et al.* (2012) Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*. *Anal Biochem* **421**: 657–666.
- Di Guilmi, A.M., Dessen, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003) The glycosyltransferase domain of penicillin-binding-protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* catalyzes the polymerization of murein glycan chains. *J Bacteriol* **185**: 4418–4423.
- Eberhardt, A., Wu, L.J., Errington, J., Vollmer, W., and Jan-Willem Veening, J.W. (2009) Cellular localization of choline-utilization proteins in *Streptococcus pneumoniae* using novel fluorescent reporter systems. *Mol Microbiol* **74**: 395–408.
- Echenique, J., Kadioglu, A., Romao, S., Andrew, P.W., and Trombe, M.C. (2004) Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **72**: 2434–2437.
- Errington, J., Daniel, R.A., and Scheffers, D.-J. (2003) Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 52–65.
- Fiuzza, M., Canova, M.J., Zanella-Cleon, I., Becchi, M., Cozzone, A.J., Mateos, L.M., *et al.* (2008) From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division. *J Biol Chem* **283**: 18099–18112.
- Fleurie, A., Cluzel, C., Guiral, S., Freton, C., Galisson, F., Zanella-Cleon, I., *et al.* (2012) Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **83**: 746–758.
- Giefing, C., Jelenics, K.E., Gelbmann, D., Senn, B.M., and Nagy, E. (2010) The pneumococcal eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP co-localizes with the cell division apparatus and interacts with FtsZ *in vitro*. *Microbiology* **156**: 1697–1707.
- Goehring, N.W., and Beckwith, J. (2005) Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr Biol* **15**: R514–R526.
- Gordon, E., Mouz, N., Duée, E., and Dideberg, O. (2000) The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J Mol Biol* **299**: 477–485.
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., and Hanahan, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4645–4649.
- Hayashi, K. (1975) A rapid determination of sodium dodecyl sulfate with méthylène blue. *Anal Biochem* **67**: 503–506.
- Helassa, N., Vollmer, W., Breukink, E., Vernet, T., and Zapun, A. (2012) The membrane anchor of penicillin-binding protein PBP2a from *Streptococcus pneumoniae* influences peptidoglycan chain length. *FEBS J* **279**: 2071–2081.
- Hussain, H., Branny, P., and Allan, E. (2006) A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase is required for biofilm formation, genetic competence, and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **188**: 1628–1632.
- Jin, H., and Pancholi, V. (2006) Identification and biochemical characterization of a eukaryotic-type serine/threonine kinase and its cognate phosphatase in *Streptococcus pyogenes*: their biological functions and substrate identification. *J Mol Biol* **357**: 1351–1372.
- Kang, C.M., Abbott, D.W., Park, S.T., Dascher, C.C., Cantley, L.C., and Husson, R.N. (2005) The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes Dev* **19**: 1692–1704.
- Kell, C.M., Sharma, U.K., Dowson, C.G., Town, C., Balganes, T.S., and Spratt, B.G. (1993) Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **106**: 171–175.
- Land, A.D., and Winkler, M.E. (2011) The requirement for pneumococcal MreC and MreD is relieved by inactivation of the gene encoding PBP1a. *J Bacteriol* **193**: 4166–4179.

- Le Gouëllec, A., Roux, L., Fadda, D., Massidda, O., Vernet, T., and Zapun, A. (2008) Roles of pneumococcal DivIB in cell division. *J Bacteriol* **190**: 4501–4511.
- Lippok, S., Seidel, S.A.I., Duhr, S., Uhland, K., Holthoff, H.P., Jenne, D., and Braun, D. (2012) Direct detection of antibody concentration and affinity in human serum using microscale thermophoresis. *Anal Chem* **84**: 3523–3530.
- Maestro, B., Novakova, L., Heseck, D., Lee, M., Leyva, E., Mobashery, S., et al. (2011) Recognition of peptidoglycan and beta-lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae*. *FEBS Lett* **585**: 357–363.
- Massidda, O., Anderluzzi, D., Friedli, L., and Feger, G. (1998) Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **144**: 3069–3078.
- Mir, M., Asong, J., Li, X., Cardot, J., Boons, G.J., and Husson, R.N. (2011) The extracytoplasmic domain of the *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr kinase PknB binds specific mucopeptides and is required for PknB localization. *PLoS Pathog* **7**: e1002182.
- Mohammadi, T., van Dam, V., Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., et al. (2011) Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J* **20**: 1425–1432.
- Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003) Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol Microbiol* **50**: 845–855.
- Noirclerc-Savoie, M., Le Gouëllec, A., Morlot, C., Dideberg, O., Vernet, T., and Zapun, A. (2005) *In vitro* reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **55**: 413–424.
- Novakova, L., Saskova, L., Pallova, P., Janecek, J., Novotna, J., Ulrych, A., et al. (2005) Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. *FEBS J* **272**: 1243–1254.
- Novakova, L., Bezouskova, S., Pompach, P., Spidlova, P., Saskova, L., Weiser, J., and Branny, P. (2010) Identification of multiple substrates of the StkP Ser/Thr protein kinase in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **192**: 3629–3638.
- Paracuellos, P., Ballandras, A., Robert, X., Kahn, R., Hervé, M., Mengin-Lecreux, D., et al. (2010) The extended conformation of the 2.9-Å crystal structure of the three-PASTA domain of a Ser/Thr kinase from the human pathogen *Staphylococcus aureus*. *J Mol Biol* **404**: 847–858.
- Pares, S., Mouz, N., Pétilot, Y., Hakenbeck, R., and Dideberg, O. (1996) X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat Struct Biol* **3**: 284–289.
- Pereira, S.F., Goss, L., and Dworkin, J. (2011) Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 192–212.
- Perez-Nunez, D., Briandet, R., David, B., Gautier, C., Renault, P., Hallet, B., et al. (2011) A new morphogenesis pathway in bacteria: unbalanced activity of cell wall synthesis machineries leads to coccus-to-rod transition and filamentation in ovococci. *Mol Microbiol* **79**: 759–771.
- Saskova, L., Novakova, L., Basler, M., and Branny, P. (2007) Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **189**: 4168–4179.
- Shah, I.M., Laaberki, M.H., Popham, D.L., and Dworkin, J. (2008) A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell* **135**: 486–496.
- Sham, L.T., Tsui, H.C., Land, A., Barendt, S.M., and Winkler, M.E. (2012) Recent advances in pneumococcal peptidoglycan biosynthesis suggest new vaccine and antimicrobial targets. *Curr Opin Microbiol* **15**: 1–10.
- Shockman, G.D., Thompson, J.S., and Conover, M.J. (1967) The autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis*. II. Partial characterization of the autolysin and its substrate. *Biochemistry* **6**: 1054–1065.
- Squeglia, F., Marchetti, R., Ruggiero, A., Lanzetta, R., Marasco, D., Dworkin, J., et al. (2011) Chemical basis of peptidoglycan discrimination by PrkC, a key kinase involved in bacterial resuscitation from dormancy. *J Am Chem Soc* **133**: 20676–20679.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113–130.
- Sun, X., Ge, F., Xiao, C.L., Yin, X.F., Ge, R., Zhang, L.H., and He, Q.Y. (2010) Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteome Res* **9**: 275–282.
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A., and Vollmer, W. (2011) From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol* **28**: 123–136.
- Yeats, C., Finn, R.D., and Bateman, A. (2002) The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem Sci* **27**: 438.
- Young, T.A., Delagoutte, B., Endrizzi, J.A., Falick, A.M., and Alber, T. (2003) Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. *Nat Struct Biol* **10**: 168–174.
- Zapun, A., Vernet, T., and Pinho, M.G. (2008) The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 345–360.
- Zhao, G., Yeh, W.K., Carnahan, R.H., Flokowitsch, J., Meier, T.I., Alborn, W.E., Jr., et al. (1997) Biochemical characterization of penicillin-resistant and -sensitive penicillin-binding protein 2x transpeptidase activities of *Streptococcus pneumoniae* and mechanistic implications in bacterial resistance to beta-lactam antibiotics. *J Bacteriol* **179**: 4901–4908.

### Supporting information

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

## Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in *Streptococcus pneumoniae* R6 morphogenesis

Morlot C.<sup>1,2,3#</sup>, Bayle L.<sup>1,2,3#</sup>, Jacq M.<sup>1,2,3</sup>, Fleurie A.<sup>4</sup>, Tourcier G.<sup>1,2,3</sup>, Galisson F.<sup>4</sup>, Vernet T.<sup>1,2,3</sup>,  
Grangeasse C.<sup>4\*</sup> and Di Guilmi A.M.<sup>1,2,3\*</sup>

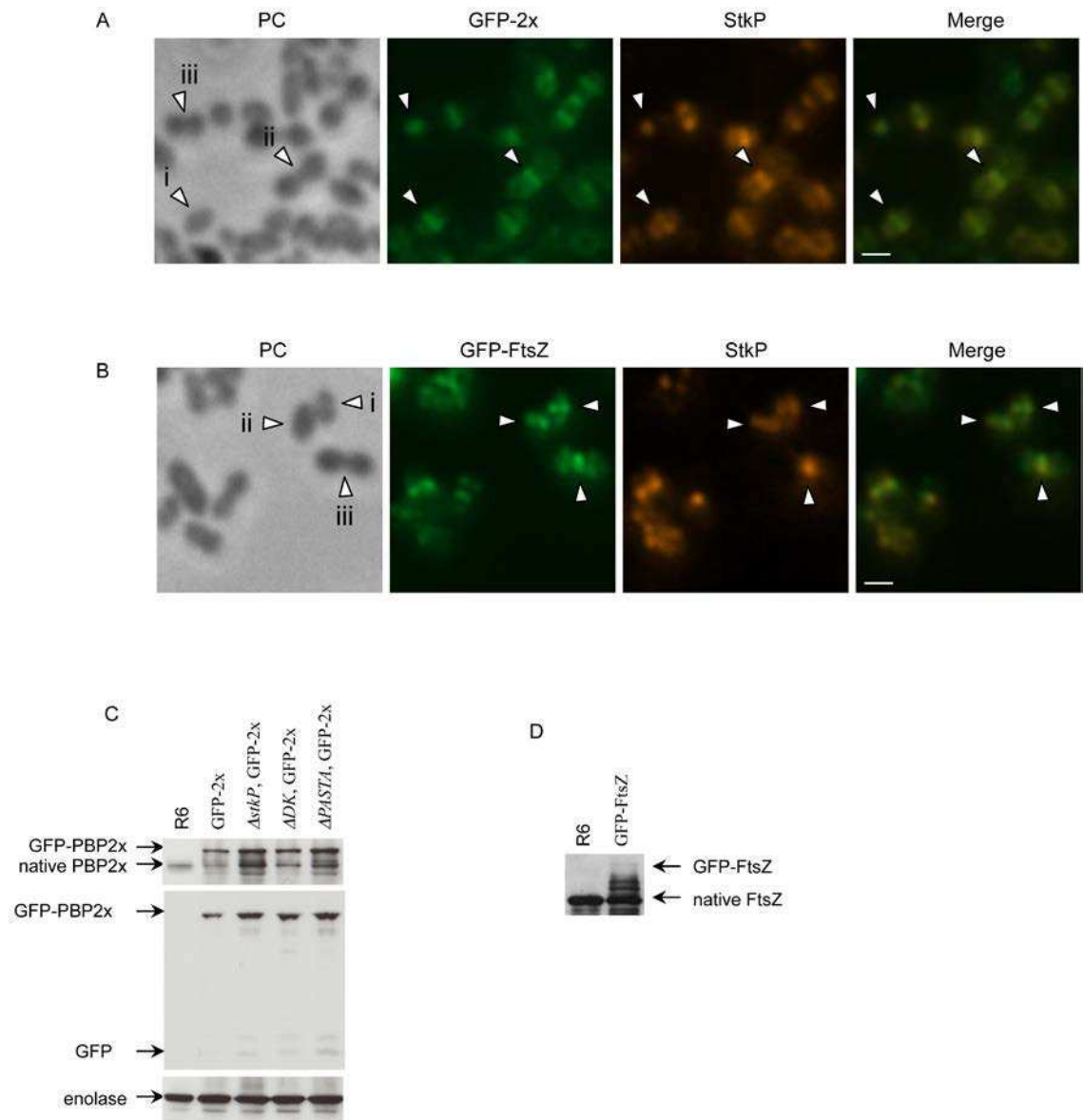
**Table S1.** Oligonucleotides used in this work

**Table S1**

Plasmids	Primer Forward	Primer Reverse
pETDuet-StkP	CGCCATATGATCCAAATCGCAAGA TTTTTGCC	GCGGGTACCTTAAGGAGTAGCTGAAGTTG TTTTAGG
pETDuet-his-PBP2FL	CGCGAATTCGAAGTGGACAAAAAGA GTAATCCG	GCGGCGGCCGCTTAGTCTCCTAAAGT TAAT GTAAT
pGEX-PBP2xDPASTA	GCTAAGGCTTTGGAGCAAGTAAGTCAATAA <u>AAGCTT</u> CTGACGATCTGCCTCGCGCTTCGGT	ACCGAAACGCGCGAGGCAGATCGTCAG <u>AAGCTTTTA</u> TTGACTTACTTGCTCCAAAGCCTTAGC
pETDuet-PBP2x-PASTA	CGCGGATCCGAGTGTCAAGGATA TTTCACCTGG	GCGAAGCTTTTAGTCTCCTAAAGTTAATGT AATTTTTTTAATGTCC
pETDuet-StkP-PASTA1234		
pETphos-StkP-PASTA123	TATCATATGTCCAGAACTCCTGCAACC	TATGGATCCTTTTTTAGCTACTGTCAAG ACAATTTGAG
pETphos-StkP-PASTA12	GGAATTC <sup>C</sup> CATATGGGCAAACAATCCTT CCAAATTAG	TATGGATCCTTTTTTAGCTACTGTCAAG ACAATTTGAG
pETphos-StkP-PASTA23	GGAATTC <sup>C</sup> CATATGGGCAAACAATCCTT CCAAATTAG	TATGGATCCTTTTTTAGCTACTGTCAAG ACAATTTGAG
pETphos-StkP-PASTA1	TATCATATGTCCAGAACTCCTGCAACC	ATACGCGGATCCTTATGATGAGACAAC CAGATTAATTTTCG
pETphos-StkP-PASTA2	GGAATTC <sup>C</sup> CATATGGGCAAACAATCCTT TCCAAATTAG	TATGGATCCTTTTTTAGCTACTGTCAAG ACAATTTGAG
pETphos-StkP-PASTA3	GGAATTC <sup>C</sup> CATATGGCTACGACGATTC AATTAGGGAAC	TATGGATCCTTTTTTAGCTACTGTCAAG ACAATTTGAG
pETphos-StkP-PASTA4	GGAATTC <sup>C</sup> CATATGGTTACAAGTGTTG CCATGCC	TATGGATCCTTAAGGAGTAGCTGAAGTTG
pCM39	GGACTAGTAAGTGGACAAAAAGAGTAATCCG	ATAAGAATGCGGCCGCTTAGTCTCCTAAAGTTAATG
pCM79	GACGCGACTAGTACATTTTCATTTGATACAGCTGC	ATAAGAATGCGGCCGCTTAACGATTTTTGAAAAATGG

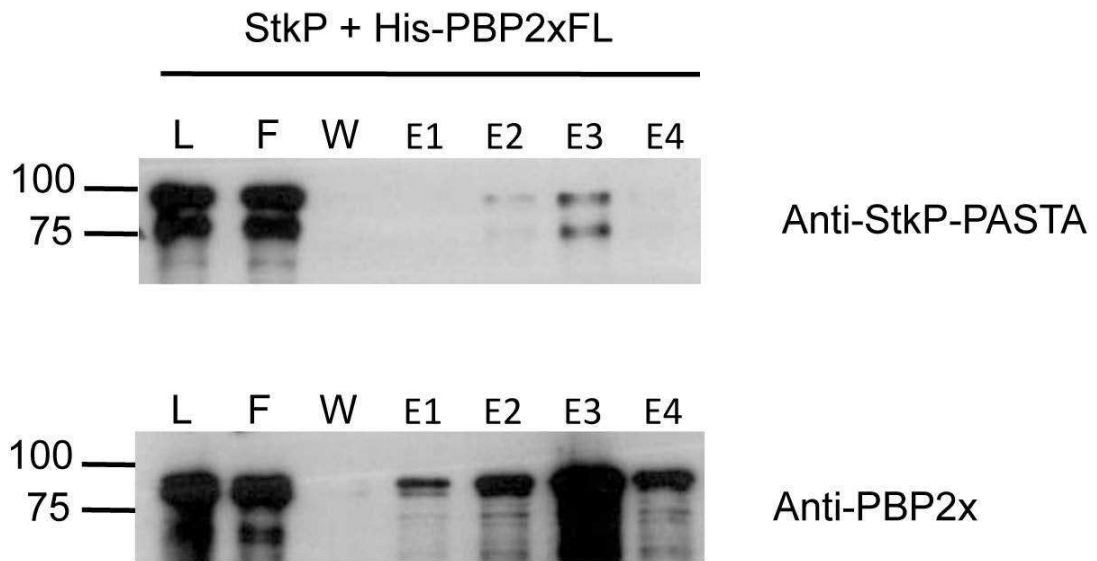
Underlined : restriction sites

Fig S1



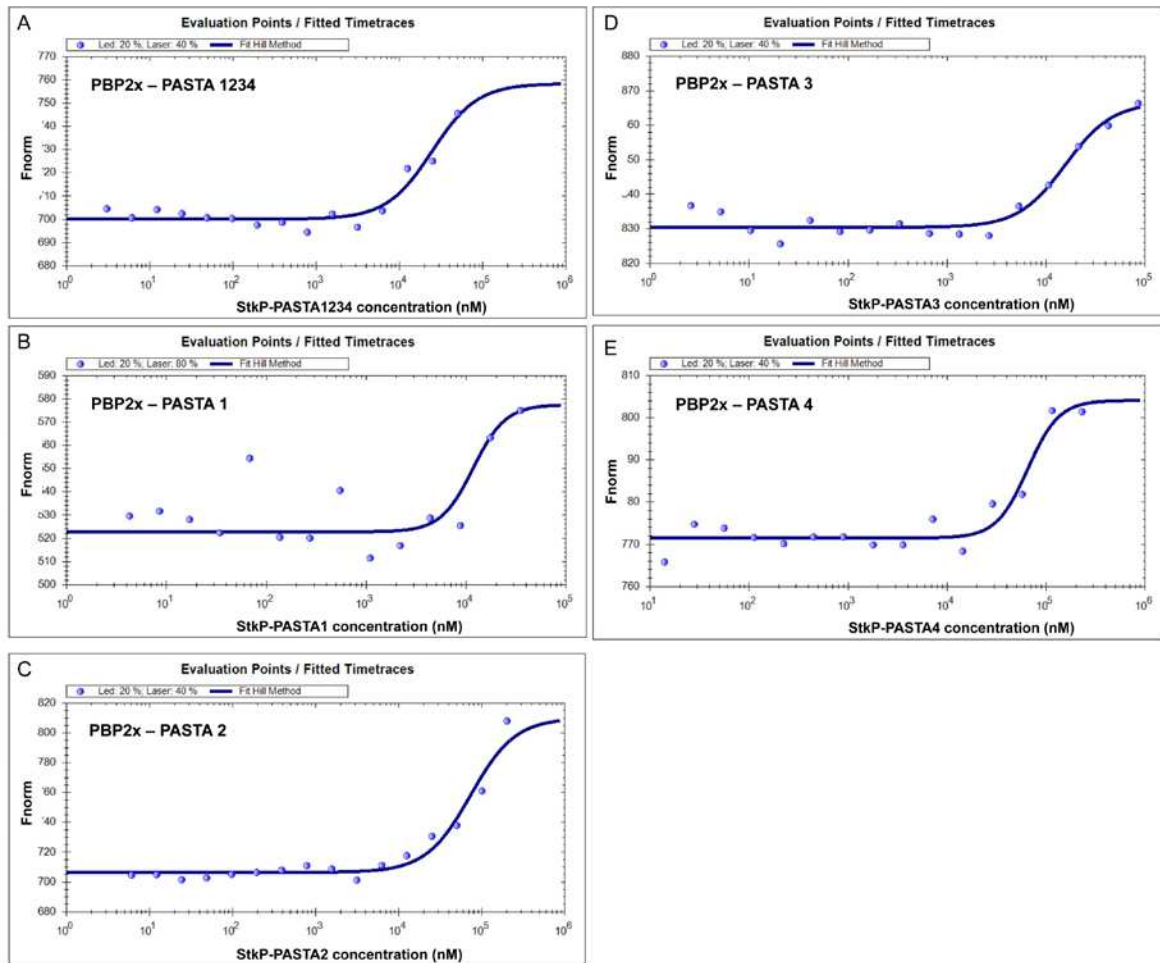
**Fig. S1.** Localization of StkP, GFP-PBP2x and GFP-FtsZ in *S. pneumoniae* R6. Large fields of cells displaying the localization of GFP-PBP2x and StkP (A) or GFP-FtsZ and StkP (B). Pneumococcal R6 cells expressing GFP fusion proteins were stained with anti-StkP-PASTA rabbit serum and Cy3-labelled anti-rabbit IgG. The merge pictures show the overlay GFP-PBP2x/StkP and GFP-FtsZ/StkP stainings. Phase contrast (PC) views are also shown. Scale bars, 1  $\mu$ m. (C) Expression levels of native PBP2x and GFP-PBP2x in *S. pneumoniae* R6 and *stkP* mutant strains. Anti-PBP2x rabbit serum (upper panel) and anti-GFP rabbit serum (middle panel) were used for Western blot detection. Enolase levels were monitored to control for loading (lower panel). (D) Expression levels of native FtsZ and GFP-FtsZ in *S. pneumoniae* R6. Anti-FtsZ rabbit serum was used for Western blot detection.

Fig S2



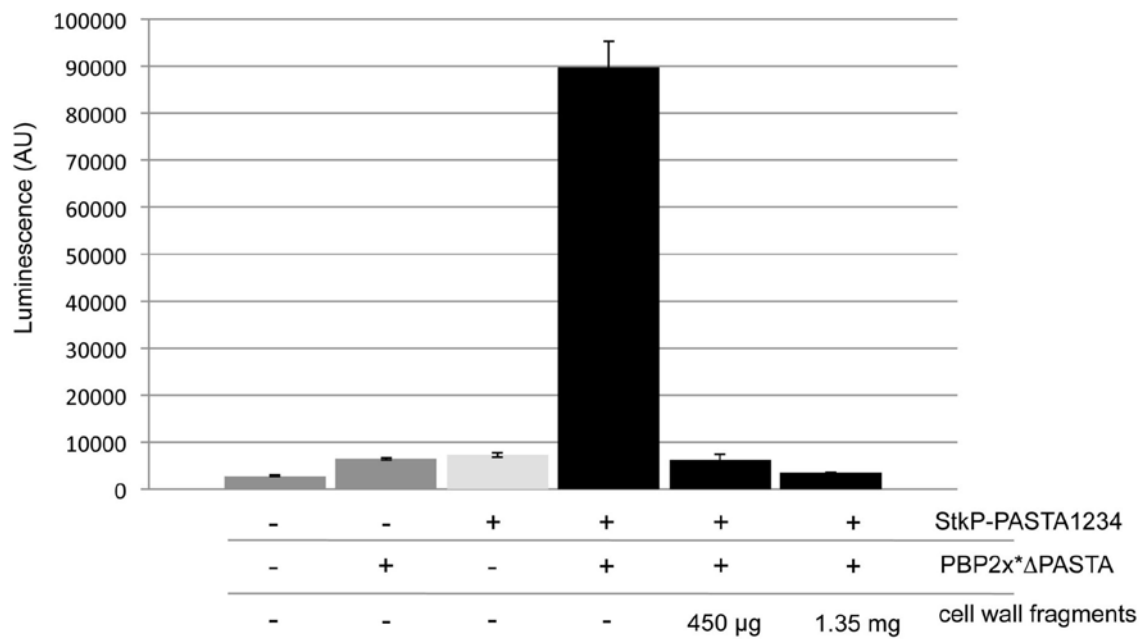
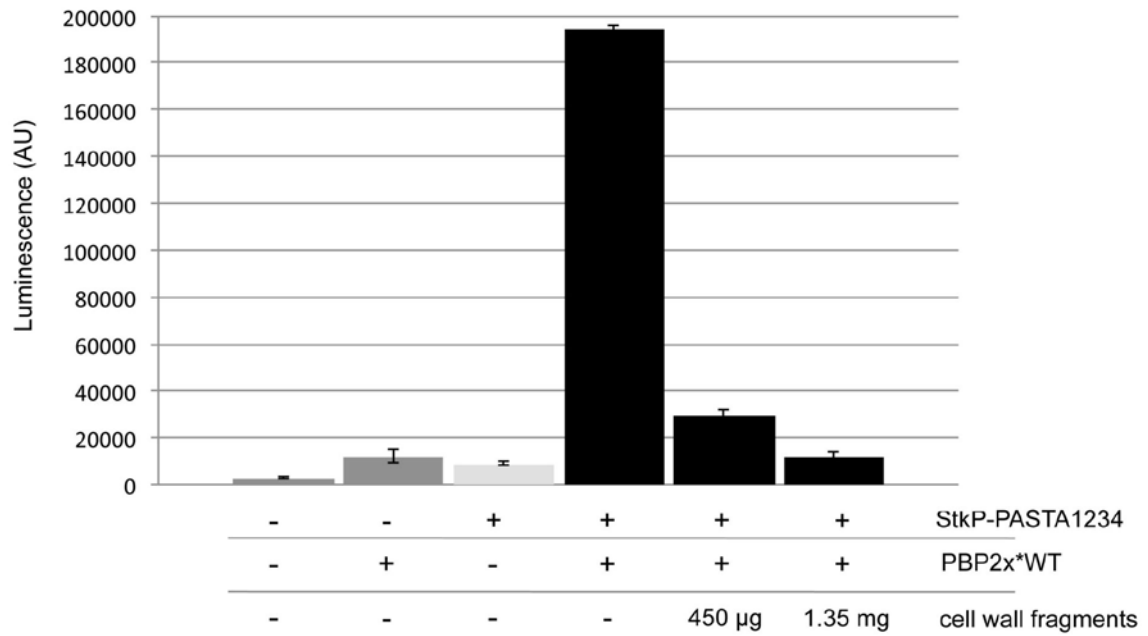
**Fig. S2.** StkP and PBP2x interact directly. Full-length forms of StkP and His-tagged PBP2x (His-PBP2xFL) were overexpressed either separately or together in *E. coli* membrane. Total membrane proteins (L) were solubilized with CHAPS and loaded onto a NiNTA affinity column, the flow-through elution was collected (F). After washing (W), retained proteins were eluted with buffer containing imidazole (elution fractions E1 to E4). Samples were analyzed by Western blot using anti-PBP2x and anti-StkP-PASTA rabbit sera as indicated on the right of each figure.

Fig S3



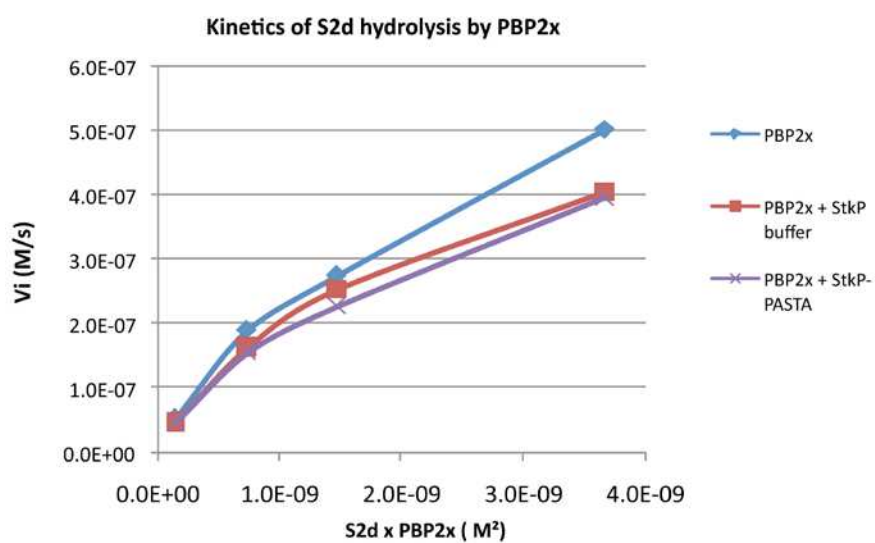
**Fig. S3.** Affinity measurements by Microscale Thermophoresis of PBP2x binding to increasing concentrations of StkP-PASTA-1234 (A), StkP-PASTA-1 (B), StkP-PASTA-2 (C), StkP-PASTA-3 (D) and StkP-PASTA-4 (E). Fnorm (normalized fluorescence = fluorescence after thermophoresis / initial fluorescence) is reported on the Y axis and StkP-PASTA concentrations on the x-Axis are plotted in nM.

Fig S4



**Fig. S4.** Dose-dependence effect of the presence of cell wall fragments on the destabilization of the complex between StkP-PASTA-1234 and the extracellular region of PBP2x (PBP2x\*WT) or between StkP-PASTA-1234 and PBP2x deleted from the PASTA-N and PASTA-C domains (PBP2x\*ΔPASTA).

Fig S5



**Fig. S5.** Influence of StkP-PASTA -1234 domains on the kinetics of S2d hydrolysis by PBP2x. The initial rate ( $V_i$ ) of S2d hydrolysis has been plotted against concentrations of S2d and PBP2x.





## Annexe n°II : Script Matlab : calcul du diamètre de l'anneau Z

```
% Used to extract length data from PALM images obtained in microbeTracker
% handmade selection.
% Version 2 - 2015 November 13 - Maxime Jacq (IBS)

% load(filename)
%gaussienne :  $y = a \exp(-(x-b)^2/2c^2)$  a = height of maximum, c relates to
width of half maximum, b is location of maximum)

%_____ask directory and file_____
cur = pwd; %Find the current directory
if isappdata(0, 'Last_Directory')
    last_dir = getappdata(0, 'Last_Directory');
    if last_dir ~= 0
        if exist(last_dir, 'dir')
            cd(last_dir);
        end
    end
end
[fname, pname] = uigetfile({'*.mat', '*.mat Files'}, 'Select length .mat
file:');
if fname~=0 %load the appropriate mat file if valid
    mat_file = [pname, fname];
else
    return
end
if pname ~=0
    if exist(pname, 'dir')
        setappdata(0, 'Last_Directory', pname);
    end
end
cd(cur); %Reset active directory
load(mat_file);
%_____end of_ask directory and file_____
n_cell=[0];
n_cell=size(cellList{1});
n_cell=n_cell(2);

filename='Longueur_FtsZ_new.xlsx'; % excel file name. Will be save in
current Matlab directory
ligne='A1'; % row used in the excel file, typically :
stream_number.
pixel_size=9.48444; %[nm] !!! pixel_size de l'image !!! ( 106.7 (pixel size
in camera) / 11.25 (expansion_factor used when render)
cell_number_array=(1:n_cell);
length_array=zeros(1, n_cell);
profile_threshold=95; % profile_threshold in percentage
fwhm_array=zeros(1, n_cell);
%_____end of Input_____
figure(1);

for i=1:n_cell

    data=cellList{1}{i};
    if ~isempty(data)
        cell_fluo_profile=data.signal1;
```

```

length_array(i)=data.length;
size_cell_fluo_profile=size(cell_fluo_profile);
size_cell_fluo_profile= size_cell_fluo_profile(1);

mean_profile=mean(cell_fluo_profile);
w=find(cell_fluo_profile>mean_profile*profile_threshold/100);
if ~isempty(w)
FtsZ_ring=cell_fluo_profile(w);
start_profile=min(w);
end_profile=max(w);
length_array(i)=(end_profile-start_profile)*pixel_size;

cell_fluo_profile_fitted=zeros(1,size_cell_fluo_profile);
cell_fluo_profile_fitted(start_profile:end_profile)= mean_profile;
x=(1:size_cell_fluo_profile);

%display figure data
figure(1);
plot(x,cell_fluo_profile)
hold on
plot(x,cell_fluo_profile_fitted,'color','r')
hold off

display(i);
disp(['length = ', num2str(length_array(i))]);

%ok=input('ok?'); % to see if plot and accept it.

else
length_array(i)=0;
disp('impossible to extract length');
end
end

end

figure(2)
plot(cell_number_array,length_array,'*r');
disp('nombre de cellules analysés =')
disp(length(length_array));
status =xlswrite(filename,length_array,'longueur',ligne);
if ~isempty(status);
disp('fichier excel ok');
else
disp('probleme d enregistrement dans le fichier excel. Avez-vous
pensez à fermer le fichier excel?');
end
end

```

## Annexe n°III : Script Matlab : calcul de la largeur de l'anneau Z

```
% filename='dddd'
% load(filename)
% Gaussian1_fit2 : program with a gaussian function
% Gaussian :  $y = a \exp(-(x-b)^2/2c^2)$  a = height of maximum, c relates to
width of half maximum, b is location of maximum)
n_cell=[0];

%_____ask directory and file_____
cur = pwd; %Find the current directory
if isappdata(0, 'Last Directory')
    last_dir = getappdata(0, 'Last Directory');
    if last_dir ~= 0
        if exist(last_dir,'dir')
            cd(last_dir);
        end
    end
end
[fname,pname] = uigetfile({'*.mat','*.mat Files'},'Select length .mat
file:');
if fname~=0 %load the appropriate mat file if valid
    mat_file = [pname,fname];
else
    return
end
if pname ~=0
    if exist(pname,'dir')
        setappdata(0, 'Last Directory', pname);
    end
end
load(mat_file);
%_____end of_ask directory and file_____

filename='width.xlsx'; % excel fichier name
ligne='A1'; % row used in the excel file, typically :
stream_number.

pixel_size=9.48444; %[nm] image pixel_size ( 106.7 (pixel size in camera) /
11.25 (expansion_factor used when render)
length_array=zeros(1,n_cell);
fwhm_array=zeros(1,n_cell);

n_cell=size(cellList{1});
n_cell=n_cell(2);
figure(1);

for i=1:n_cell

    data=cellList{1}{i};
    if ~isempty(data)
        cell_fluo_profile=data.signal1;
        if ~isempty(cell_fluo_profile);
            length_array(i)=data.length;

            fit_p=Gaussian1_fit2(cell_fluo_profile);
            x=(1:length(cell_fluo_profile));
            cell_fluo_profile_fitted=fit_p.a1*exp(-((x-fit_p.b1)/fit_p.c1).^2);

            figure(1);
```

```

plot(x,cell_fluo_profile)
hold on
plot(x,cell_fluo_profile_fitted,'color','r')
hold off
%Get FWHM
max_profile=max(cell_fluo_profile_fitted);
n_above_max=find(cell_fluo_profile_fitted >= max_profile/2);
fwhm_array(i)=length(n_above_max)*pixel_size;
%display information
disp(['FWHM = ', num2str(fwhm_array(i))]);
display(i);
%ok=input('ok?'); % to see if plot and accept it.

end
end
end

figure(2)
plot(length_array,fwhm_array,'*r');
disp('nombre de cellules analysés =')
disp(length(fwhm_array));
status =xlswrite(filename,fwhm_array,'width',ligne);
if ~isempty(status);
    disp('fichier excel ok');
else
    disp('probleme d enregistrement dans le fichier excel. Avez-vous
pensez à fermer le fichier excel?');
end

cd(cur); %Reset active directory

```

## Annexe n°IV : Script ImageJ : Destacking.txt

Ce script est utilisé pour séparer les images prises avec microscope Olympus du groupe PG contenant plusieurs couches d'images (Contraste de phase, Fluorescence n°1 et Fluorescence n°2) dans un fichier. Il sépare chaque couche d'images, les convertit en niveau de gris 16-bits puis enregistre chaque couche dans un dossier séparé. Ces dossiers peuvent ensuite être chargé dans MicrobeTracker (ou Oufiti) pour l'analyse de la fluorescence.

Içi, l'image de base comporte 3 couches : Fluorescence n°1 (GFP), Fluorescence n°2 (Cy3) et le contraste de phase (BF).

```

// De-stacking macro version 1.1

// This macro is made to de-stack images 3 color stack and convert them
into 16 bit format.

// Made for IBS/PG group from data taken as follow : GFP, Cy3, BF.

// created by Maxime Jacq - maximejacq1@gmail.com -

```

```

// Directory where stack images are found
dir = getDirectory("Choose a Directory to PROCESS");
    list = getFileList(dir);

// Directory where GFP (1rst image) while be saved
dir2 = getDirectory("Choose Destination for GFP image");

// Directory where Cy3 (2nd image) while be saved
dir3 = getDirectory("Choose Destination for Cy3 image");

// Directory where BrighField (3th image) while be saved
dir4 = getDirectory("Choose Destination for BF image");
// Loop creation
setBatchMode(true);
    for (f=0; f<list.length; f++) {
        path = dir+list[f];
print(path);
        showProgress(f, list.length);
        if (!endsWith(path, "/")) open(path);
if (nImages>=1) {
    if (endsWith(path, "f")) {

// Get the title and supress .tif extension
title=getTitle();
if(endsWith(title, ".tif"))
title=substring(title, 0, lengthOf(title)-4);
// Take slice 1 (First image), duplicate it, name it with the label
"_GFP", turn it into 16 bit images and save in the right directory
// Change "_GFP" found below by your fluorophore (used for the 1rst image)
titlefluo=title+"_GFP.tif";
setSlice(1);
run("Duplicate...", "title=titlefluo");
run("16-bit");

```

```

saveAs("Tiff", dir2+titlefluo);

close();

// Take slice 2 (Second image), duplicate it, name it with the label
"_Cy3", turn it into 16 bit images and save in the right directory

// Change "_Cy3" found below by your 2nd fluorophore (used for the 2nd
image)

setSlice(2);

titlefluo2=title+"_cy3.tif";

run("Duplicate...", "title=titlefluo2");

run("16-bit");

saveAs("Tiff", dir3+titlefluo2);

close();

// Take slice 3 (3th image), duplicate it, name it with the label "_BF",
turn it into 16 bit images and save in the right directory

setSlice(3);

titleBF=title+"_BF.tif";

run("Duplicate...", "title=titleBF");

run("16-bit");

saveAs("Tiff", dir4+titleBF);

close();

close();

    }

}

}

showStatus("done");

showMessage("My job is done. Now, go back to work and analyze those images
on MicrobeTracker.");

```

# Références

---

Aasjord, P., and Grov, A. (1980). Immunoperoxidase and Electron Microscopy Studies of Staphylococcal Lipoteichoic Acid. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B]* 88B, 47–52.

Abdullah, M.R., Gutiérrez-Fernández, J., Pribyl, T., Gisch, N., Saleh, M., Rohde, M., Petruschka, L., Burchhardt, G., Schwudke, D., Hermoso, J.A., et al. (2014). Structure of the pneumococcal l,d-carboxypeptidase DacB and pathophysiological effects of disabled cell wall hydrolases DacA and DacB. *Mol. Microbiol.* 93, 1183–1206.

Abeyta, M., Hardy, G.G., and Yother, J. (2003). Genetic Alteration of Capsule Type but Not PspA Type Affects Accessibility of Surface-Bound Complement and Surface Antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 71, 218–225.

Adams, D.W., Wu, L.J., and Errington, J. (2015). Nucleoid occlusion protein Noc recruits DNA to the bacterial cell membrane. *EMBO J.* 34, 491–501.

Addinall, S.G., Bi, E., and Lutkenhaus, J. (1996). FtsZ ring formation in fts mutants. *J. Bacteriol.* 178, 3877–3884.

Adegbola, R.A., DeAntonio, R., Hill, P.C., Roca, A., Usuf, E., Hoet, B., and Greenwood, B.M. (2014). Carriage of *Streptococcus pneumoniae* and Other Respiratory Bacterial Pathogens in Low and Lower-Middle Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 9.

Akhtar, P., Anand, S.P., Watkins, S.C., and Khan, S.A. (2009). The tubulin-like RepX protein encoded by the pXO1 plasmid forms polymers in vivo in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 191, 2493–2500.

Allen, J.S., Filip, C.C., Gustafson, R.A., Allen, R.G., and Walker, J.R. (1974). Regulation of Bacterial Cell Division: Genetic and Phenotypic Analysis of Temperature-Sensitive, Multinucleate, Filament-Forming Mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 117, 978–986.

Anderson, D.E., Gueiros-Filho, F.J., and Erickson, H.P. (2004). Assembly Dynamics of FtsZ Rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and Effects of FtsZ-Regulating Proteins. *J. Bacteriol.* 186, 5775–5781.

Aniansson, G., Aim, B., Andersson, B., Larsson, P., Nylén, O., Peterson, H., Rigner, P., Svanborg, M., and Svanborg, C. (1992). Nasopharyngeal Colonization during the First Year of Life. *J. Infect. Dis.* 165, S38–S42.

Annibale, P., Scarselli, M., Greco, M., and Radenovic, A. (2012). Identification of the factors affecting co-localization precision for quantitative multicolor localization microscopy. *Opt. Nanoscopy* 1, 9.



Armstrong, J.J., Baddiley, J., Buchanan, J.G., Davison, A.L., Kelemen, M.V., and Neuhaus, F.C. (1959). Teichoic Acids from Bacterial Walls: Composition of Teichoic Acids from a Number of Bacterial Walls. *Nature* *184*, 247–248.

Atilano, M.L., Pereira, P.M., Yates, J., Reed, P., Veiga, H., Pinho, M.G., and Filipe, S.R. (2010). Teichoic acids are temporal and spatial regulators of peptidoglycan cross-linking in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 18991–18996.

Avery, O.T., and Cullen, G.E. (1923). Studies of the enzymes of pneumococcus : IV. Bacteriolytic enzyme. *J. Exp. Med.* *38*, 199–206.

Avery, O.T., and Dubos, R. (1931). The protective action of a specific enzyme against type iii pneumococcus infection in mice. *J. Exp. Med.* *54*, 73–89.

Aylett, C.H.S., Wang, Q., Michie, K.A., Amos, L.A., and Löwe, J. (2010). Filament structure of bacterial tubulin homologue TubZ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 19766–19771.

Badrinarayanan, A., Reyes-Lamothe, R., Uphoff, S., Leake, M.C., and Sherratt, D.J. (2012). In vivo architecture and action of bacterial structural maintenance of chromosome proteins. *Science* *338*, 528–531.

Bai, X.-H., Chen, H.-J., Jiang, Y.-L., Wen, Z., Huang, Y., Cheng, W., Li, Q., Qi, L., Zhang, J.-R., Chen, Y., et al. (2014). Structure of Pneumococcal Peptidoglycan Hydrolase LytB Reveals Insights into the Bacterial Cell Wall Remodeling and Pathogenesis. *J. Biol. Chem.* *289*, 23403–23416.

Barendt, S.M., Sham, L.-T., and Winkler, M.E. (2011). Characterization of Mutants Deficient in the L,D-Carboxypeptidase (DacB) and WalRK (VicRK) Regulon, Involved in Peptidoglycan Maturation of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 2 Strain D39. *J. Bacteriol.* *193*, 2290–2300.

Barnickel, G., Labischinski, H., Bradaczek, H., and Giesbrecht, P. (1979). Conformational energy calculation on the peptide part of murein. *Eur. J. Biochem. FEBS* *95*, 157–165.

Bartual, S.G., Straume, D., Stamsås, G.A., Muñoz, I.G., Alfonso, C., Martínez-Ripoll, M., Håvarstein, L.S., and Hermoso, J.A. (2014). Structural basis of PcsB-mediated cell separation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Commun.* *5*, 3842.

Begg, K.J., and Donachie, W.D. (1985). Cell shape and division in *Escherichia coli*: experiments with shape and division mutants. *J. Bacteriol.* *163*, 615–622.

Begg, K.J., Dewar, S.J., and Donachie, W.D. (1995). A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*. *J. Bacteriol.* *177*, 6211–6222.

Beilharz, K., Nováková, L., Fadda, D., Branny, P., Massidda, O., and Veening, J.-W. (2012). Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E905–E913.

- Benkert, P., Biasini, M., and Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *27*, 343–350.
- Ben-Yehuda, S., and Losick, R. (2002). Asymmetric Cell Division in *B. subtilis* Involves a Spiral-like Intermediate of the Cytokinetic Protein FtsZ. *Cell* *109*, 257–266.
- Bera, A., Biswas, R., Herbert, S., Kulauzovic, E., Weidenmaier, C., Peschel, A., and Götz, F. (2007). Influence of Wall Teichoic Acid on Lysozyme Resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *189*, 280–283.
- Berg, K.H., Ohnstad, H.S., and Havarstein, L.S. (2011). LytF, a Novel Competence-Regulated Murein Hydrolase in the Genus *Streptococcus*. *J. Bacteriol.* *194*, 627–635.
- Berg, K.H., Stamsås, G.A., Straume, D., and Håvarstein, L.S. (2013). Effects of low PBP2b levels on cell morphology and peptidoglycan composition in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J. Bacteriol.* *195*, 4342–4354.
- Bernhardt, T.G., and de Boer, P.A.J. (2005). SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Mol. Cell* *18*, 555–564.
- Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H.F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* *313*, 1642–1645.
- Bhavsar, A.P., Beveridge, T.J., and Brown, E.D. (2001). Precise deletion of tagD and controlled depletion of its product, glycerol 3-phosphate cytidyltransferase, leads to irregular morphology and lysis of *Bacillus subtilis* grown at physiological temperature. *J. Bacteriol.* *183*, 6688–6693.
- Bi, E.F., and Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* *354*, 161–164.
- Biller, S.J., and Burkholder, W.F. (2009). The *Bacillus subtilis* SftA (YtpS) and SpoIIIE DNA translocases play distinct roles in growing cells to ensure faithful chromosome partitioning. *Mol. Microbiol.* *74*, 790–809.
- Biteen, J.S., Goley, E.D., Shapiro, L., and Moerner, W.E. (2012). Three-Dimensional Super-Resolution Imaging of the Midplane Protein FtsZ in Live *Caulobacter crescentus* Cells Using Astigmatism. *ChemPhysChem* *13*, 1007–1012.
- Black, S., Shinefield, H., Cohen, R., Floret, D., Gaudelus, J., Olivier, C., and Reinert, P. (2004). [Clinical effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine (Prevenar) against invasive pneumococcal diseases: prospects for children in France]. *Arch. Pédiatrie Organe Off. Société Fr. Pédiatrie* *11*, 843–853.

- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., et al. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453–1462.
- de Boer, P., Crossley, R., and Rothfield, L. (1992). The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* 359, 254–256.
- Boneca, I.G., Huang, Z.H., Gage, D.A., and Tomasz, A. (2000). Characterization of *Staphylococcus aureus* cell wall glycan strands, evidence for a new beta-N-acetylglucosaminidase activity. *J. Biol. Chem.* 275, 9910–9918.
- Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J., and Schwede, T. (2009). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat. Protoc.* 4, 1–13.
- Bork, P., Sander, C., and Valencia, A. (1992). An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7290–7294.
- Bramhill, D. (1997). Bacterial cell division. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 395–424.
- Bramhill, D., and Thompson, C.M. (1994). GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5813–5817.
- Bramkamp, M., Emmins, R., Weston, L., Donovan, C., Daniel, R.A., and Errington, J. (2008). A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. *Mol. Microbiol.* 70, 1556–1569.
- Braun, V. (1973). Molecular organization of the rigid layer and the cell wall of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 128, Suppl:9–16.
- Brown, S., Santa Maria, J.P., and Walker, S. (2013). Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 313–336.
- Bui, N.K., Eberhardt, A., Vollmer, D., Kern, T., Bougault, C., Tomasz, A., Simorre, J.-P., and Vollmer, W. (2012). Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*. *Anal. Biochem.* 421, 657–666.
- Burdett, I.D., and Murray, R.G. (1974). Septum formation in *Escherichia coli*: characterization of septal structure and the effects of antibiotics on cell division. *J. Bacteriol.* 119, 303–324.
- Buss, J., Coltharp, C., Huang, T., Pohlmeier, C., Wang, S.-C., Hatem, C., and Xiao, J. (2013). *In vivo* organization of the FtsZ-ring by ZapA and ZapB revealed by quantitative super-resolution microscopy: PALM reveals ZapA and ZapB organizing FtsZ clusters. *Mol. Microbiol.* 89, 1099–1120.
- Camberg, J.L., Hoskins, J.R., and Wickner, S. (2009). ClpXP protease degrades the cytoskeletal protein, FtsZ, and modulates FtsZ polymer dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10614–10619.

- Carballido-López, R. (2006). Orchestrating bacterial cell morphogenesis. *Mol. Microbiol.* *60*, 815–819.
- Carballido-López, R., Formstone, A., Li, Y., Ehrlich, S.D., Noirot, P., and Errington, J. (2006). Actin homolog MreBH governs cell morphogenesis by localization of the cell wall hydrolase LytE. *Dev. Cell* *11*, 399–409.
- Cardaci, A., Papasergi, S., Midiri, A., Mancuso, G., Domina, M., Cariccio, V.L., Mandanici, F., Galbo, R., Passo, C.L., Pernice, I., et al. (2012). Protective Activity of *Streptococcus pneumoniae* Spr1875 Protein Fragments Identified Using a Phage Displayed Genomic Library. *PLoS ONE* *7*, e36588.
- Cattoni, D., Fiche, J., and Nöllmann, M. (2012). Single-molecule super-resolution imaging in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *15*, 758–763.
- Cattoni, D.I., Thakur, S., Godefroy, C., Le Gall, A., Lai-Kee-Him, J., Milhiet, P.-E., Bron, P., and Nöllmann, M. (2014). Structure and DNA-binding properties of the *Bacillus subtilis* SpoIIIE DNA translocase revealed by single-molecule and electron microscopies. *Nucleic Acids Res.* *42*, 2624–2636.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* *263*, 802–805.
- Chen, Y., and Erickson, H.P. (2005). Rapid in Vitro Assembly Dynamics and Subunit Turnover of FtsZ Demonstrated by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *J. Biol. Chem.* *280*, 22549–22554.
- Chen, Y., and Erickson, H.P. (2008). In Vitro Assembly Studies of FtsZ/Tubulin-like Proteins (TubZ) from *Bacillus* Plasmids. *J. Biol. Chem.* *283*, 8102–8109.
- Cho, H., and Bernhardt, T.G. (2013). Identification of the SlmA active site responsible for blocking bacterial cytokinetic ring assembly over the chromosome. *PLoS Genet.* *9*, e1003304.
- Chudakov, D.M., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2007). Using photoactivatable fluorescent protein Dendra2 to track protein movement. *Biotechniques* *42*, 553.
- Chung, K.-M., Hsu, H.-H., Yeh, H.-Y., and Chang, B.-Y. (2007). Mechanism of regulation of prokaryotic tubulin-like GTPase FtsZ by membrane protein EzrA. *J. Biol. Chem.* *282*, 14891–14897.
- Claessen, D., Emmins, R., Hamoen, L.W., Daniel, R.A., Errington, J., and Edwards, D.H. (2008). Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *68*, 1029–1046.
- Clarke, A.J., and Dupont, C. (1992). O-acetylated peptidoglycan: its occurrence, pathological significance, and biosynthesis. *Can. J. Microbiol.* *38*, 85–91.

- Claverys, J.-P., Prudhomme, M., and Martin, B. (2006). Induction of Competence Regulons as a General Response to Stress in Gram-Positive Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* *60*, 451–475.
- Cleverley, R.M., Barrett, J.R., Baslé, A., Bui, N.K., Hewitt, L., Solovyova, A., Xu, Z.-Q., Daniel, R.A., Dixon, N.E., Harry, E.J., et al. (2014). Structure and function of a spectrin-like regulator of bacterial cytokinesis. *Nat. Commun.* *5*, 5421.
- Coltharp, C., and Xiao, J. (2012). Superresolution microscopy for microbiology: Superresolution microscopy for microbiology. *Cell. Microbiol.* *14*, 1808–1818.
- Coltharp, C., Buss, J., Plumer, T.M., and Xiao, J. (2016). Defining the rate-limiting processes of bacterial cytokinesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Crisostomo, M.I., Vollmer, W., Kharat, A.S., Inhulsen, S., Gehre, F., Buckenmaier, S., and Tomasz, A. (2006). Attenuation of penicillin resistance in a peptidoglycan O-acetyl transferase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* *61*, 1497–1509.
- Dai, K., and Lutkenhaus, J. (1992). The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *174*, 6145–6151.
- Daniel, R.A., and Errington, J. (2003). Control of Cell Morphogenesis in Bacteria: Two Distinct Ways to Make a Rod-Shaped Cell. *Cell* *113*, 767–776.
- Deibel, R.H., and Seeley, H.J. (1974). Family II. Streptococcaceae. In: R.E. Buchanan and N.E. Gibbons. pp. 490–515.
- De Las Rivas, B., García, J.L., López, R., and García, P. (2002). Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-beta-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J. Bacteriol.* *184*, 4988–5000.
- D’Elia, M.A., Millar, K.E., Beveridge, T.J., and Brown, E.D. (2006). Wall teichoic acid polymers are dispensable for cell viability in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *188*, 8313–8316.
- Denapaite, D., Brückner, R., Hakenbeck, R., and Vollmer, W. (2012). Biosynthesis of Teichoic Acids in *Streptococcus pneumoniae* and Closely Related Species: Lessons from Genomes. *Microb. Drug Resist.* *18*, 344–358.
- Diaspro, A., Chirico, G., Usai, C., Ramoino, P., and Dobrucki, J. (2006). Photobleaching. In *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, J.B. Pawley, ed. (Springer US), pp. 690–702.
- Doi, M., Wachi, M., Ishino, F., Tomioka, S., Ito, M., Sakagami, Y., Suzuki, A., and Matsushashi, M. (1988). Determinations of the DNA sequence of the mreB gene and of the gene products of the mre region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* *170*, 4619–4624.
- Domenech, M., García, E., and Moscoso, M. (2012). Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Biotechnol.* *5*, 455–465.

- Du, S., and Lutkenhaus, J. (2014). SlmA antagonism of FtsZ assembly employs a two-pronged mechanism like MinCD. *PLoS Genet.* *10*, e1004460.
- Duan, C., Adam, V., Byrdin, M., Ridard, J., Kieffer-Jaquinod, S., Morlot, C., Arcizet, D., Demachy, I., and Bourgeois, D. (2013). Structural Evidence for a Two-Regime Photobleaching Mechanism in a Reversibly Switchable Fluorescent Protein. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 15841–15850.
- Duman, R., Ishikawa, S., Celik, I., Strahl, H., Ogasawara, N., Troc, P., Lowe, J., and Hamoen, L.W. (2013). Structural and genetic analyses reveal the protein SepF as a new membrane anchor for the Z ring. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, E4601–E4610.
- Dupont, C., and Clarke, A.J. (1991). Dependence of lysozyme-catalysed solubilization of *Proteus mirabilis* peptidoglycan on the extent of O-acetylation. *Eur. J. Biochem. FEBS* *195*, 763–769.
- Durand-Heredia, J., Rivkin, E., Fan, G., Morales, J., and Janakiraman, A. (2012). Identification of ZapD as a Cell Division Factor That Promotes the Assembly of FtsZ in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *194*, 3189–3198.
- Durisic, N., Laparra-Cuervo, L., Sandoval-Álvarez, Á., Borbely, J.S., and Lakadamyali, M. (2014). Single-molecule evaluation of fluorescent protein photoactivation efficiency using an in vivo nanotemplate. *Nat. Methods* *11*, 156–162.
- Edwards, D.H., and Errington, J. (1997). The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Mol. Microbiol.* *24*, 905–915.
- Egan, A.J.F., and Vollmer, W. (2013). The physiology of bacterial cell division: Bacterial cell division. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1277*, 8–28.
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Haugen, K., Ohnstad, H.S., and Havarstein, L.S. (2009). Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology* *155*, 2223–2234.
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Straume, D., Ohnstad, H.S., Berg, K.H., Hermoso, J.A., and Håvarstein, L.S. (2010a). Pneumococcal CbpD is a murein hydrolase that requires a dual cell envelope binding specificity to kill target cells during fratricide. *Mol. Microbiol.* *76*, 905–917.
- Eldholm, V., Gutt, B., Johnsborg, O., Brückner, R., Maurer, P., Hakenbeck, R., Mascher, T., and Håvarstein, L.S. (2010b). The Pneumococcal Cell Envelope Stress-Sensing System LiaFSR Is Activated by Murein Hydrolases and Lipid II-Interacting Antibiotics. *J. Bacteriol.* *192*, 1761–1773.
- Ellwood, D.C. (1970). The wall content and composition of *Bacillus subtilis* var. niger grown in a chemostat. *Biochem. J.* *118*, 367–373.
- van den Ent, F., Amos, L.A., and Löwe, J. (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* *413*, 39–44.

- Erickson, H.P., and Osawa, M. (2010). Cell division without FtsZ – a variety of redundant mechanisms. *Mol. Microbiol.* *78*, 267–270.
- Erickson, H.P., Taylor, D.W., Taylor, K.A., and Bramhill, D. (1996). Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 519–523.
- Erickson, H.P., Anderson, D.E., and Osawa, M. (2010). FtsZ in Bacterial Cytokinesis: Cytoskeleton and Force Generator All in One. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *74*, 504–528.
- Errington, J. (2015). Bacterial morphogenesis and the enigmatic MreB helix. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 241–248.
- Eswaramoorthy, P., Erb, M.L., Gregory, J.A., Silverman, J., Pogliano, K., Pogliano, J., and Ramamurthi, K.S. (2011). Cellular architecture mediates DivIVA ultrastructure and regulates min activity in *Bacillus subtilis*. *mBio* *2*.
- Fadda, D., Pischedda, C., Caldara, F., Whalen, M.B., Anderluzzi, D., Domenici, E., and 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*, 6209–6214.
- Fadda, D., Santona, A., D’Ulisse, V., Ghelardini, P., Ennas, M.G., Whalen, M.B., and Massidda, O. (2006). *Streptococcus pneumoniae* DivIVA: Localization and Interactions in a MinCD-Free Context. *J. Bacteriol.* *189*, 1288–1298.
- Fiche, J.-B., Cattoni, D.I., Diekmann, N., Langerak, J.M., Clerte, C., Royer, C.A., Margeat, E., Doan, T., and Nöllmann, M. (2013). Recruitment, Assembly, and Molecular Architecture of the SpoIIIE DNA Pump Revealed by Superresolution Microscopy. *PLoS Biol.* *11*, e1001557.
- Figueiredo, T.A., Sobral, R.G., Ludovice, A.M., Almeida, J.M.F. de, Bui, N.K., Vollmer, W., de Lencastre, H., and Tomasz, A. (2012). Identification of genetic determinants and enzymes involved with the amidation of glutamic acid residues in the peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* *8*, e1002508.
- Fischer, W. (1997). Pneumococcal lipoteichoic and teichoic acid. *Microb. Drug Resist. Larchmt.* *N 3*, 309–325.
- Fiser, A., Filipe, S.R., and Tomasz, A. (2003). Cell wall branches, penicillin resistance and the secrets of the MurM protein. *Trends Microbiol.* *11*, 547–553.
- Fleurie, A., Cluzel, C., Guiral, S., Freton, C., Galisson, F., Zanella-Cleon, I., Di Guilmi, A.-M., and Grangeasse, C. (2012). Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* *83*, 746–758.
- Fleurie, A., Manuse, S., Zhao, C., Campo, N., Cluzel, C., Lavergne, J.-P., Freton, C., Combet, C., Guiral, S., Soufi, B., et al. (2014a). Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the

paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. *PLoS Genet.* *10*, e1004275.

Fleurie, A., Lesterlin, C., Manuse, S., Zhao, C., Cluzel, C., Lavergne, J.-P., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Combet, C., Kuru, E., et al. (2014b). MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* *516*, 259–262.

Formstone, A., Carballido-López, R., Noirot, P., Errington, J., and Scheffers, D.-J. (2008). Localization and interactions of teichoic acid synthetic enzymes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *190*, 1812–1821.

Fraenkel, A. (1886). Weitere Beiträge zur Lehre von den Mikroccocceen der genuinen fibrinösen Pneumonie.

Fu, G., Huang, T., Buss, J., Coltharp, C., Hensel, Z., and Xiao, J. (2010). In Vivo Structure of the *E. coli* FtsZ-ring Revealed by Photoactivated Localization Microscopy (PALM). *PLoS ONE* *5*, e12680.

Fukushima, T., Kitajima, T., Yamaguchi, H., Ouyang, Q., Furuhashi, K., Yamamoto, H., Shida, T., and Sekiguchi, J. (2008). Identification and characterization of novel cell wall hydrolase CwlT: a two-domain autolysin exhibiting n-acetylmuramidase and DL-endopeptidase activities. *J. Biol. Chem.* *283*, 11117–11125.

Gaillat, J. (1998). [Epidemiology of systemic *Streptococcus pneumoniae* infections]. *Presse Médicale Paris Fr.* *1983* *27 Suppl 1*, 9–16.

Gan, L., Chen, S., and Jensen, G.J. (2008). Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 18953–18957.

García, P., González, M.P., García, E., García, J.L., and López, R. (1999). The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol. Microbiol.* *33*, 128–138.

Garcia-Bustos, J.F., Chait, B.T., and Tomasz, A. (1987). Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* *262*, 15400–15405.

Geno, K.A., Gilbert, G.L., Song, J.Y., Skovsted, I.C., Klugman, K.P., Jones, C., Konradsen, H.B., and Nahm, M.H. (2015). Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin. Microbiol. Rev.* *28*, 871–899.

Gérard, P., Vernet, T., and Zapun, A. (2002). Membrane topology of the *Streptococcus pneumoniae* FtsW division protein. *J. Bacteriol.* *184*, 1925–1931.

Giefing, C., Meinke, A.L., Hanner, M., Henics, T., Bui, M.D., Gelbmann, D., Lundberg, U., Senn, B.M., Schunn, M., Habel, A., et al. (2008). Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J. Exp. Med.* *205*, 117–131.



- Giefing, C., Jelencsics, K.E., Gelbmann, D., Senn, B.M., and Nagy, E. (2010). The pneumococcal eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP co-localizes with the cell division apparatus and interacts with FtsZ in vitro. *Microbiology* *156*, 1697–1707.
- Gilley, R.P., and Orihuela, C.J. (2014). Pneumococci in biofilms are non-invasive: implications on nasopharyngeal colonization. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *4*.
- Glauner, B., and Höltje, J.V. (1990). Growth pattern of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *265*, 18988–18996.
- Goley, E.D., Dye, N.A., Werner, J.N., Gitai, Z., and Shapiro, L. (2010). Imaging-Based Identification of a Critical Regulator of FtsZ Protofilament Curvature in *Caulobacter*. *Mol. Cell* *39*, 975–987.
- Gordon, E., Mouz, N., Duée, E., and Dideberg, O. (2000). The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J. Mol. Biol.* *299*, 477–485.
- Gray, B.M., and Dillon, H.C. (1989). Natural history of pneumococcal infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *8*, S23–S25.
- Greenfield, D., McEvoy, A.L., Shroff, H., Crooks, G.E., Wingreen, N.S., Betzig, E., and Liphardt, J. (2009). Self-Organization of the *Escherichia coli* Chemotaxis Network Imaged with Super-Resolution Light Microscopy. *PLoS Biol.* *7*, e1000137.
- Grenga, L., Luzi, G., Paolozzi, L., and Ghelardini, P. (2008). The *Escherichia coli* FtsK functional domains involved in its interaction with its divisome protein partners. *FEMS Microbiol. Lett.* *287*, 163–167.
- Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *J. Hyg. (Lond.)* *27*, 113–159.
- Gründling, A., and Schneewind, O. (2007). Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 8478–8483.
- Gueiros-Filho, F.J., and Losick, R. (2002). A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.* *16*, 2544–2556.
- Guiral, S., Mitchell, T.J., Martin, B., and Claverys, J.-P. (2005). Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 8710–8715.
- Gündoğdu, M.E., Kawai, Y., Pavlendova, N., Ogasawara, N., Errington, J., Scheffers, D.-J., and Hamoen, L.W. (2011). Large ring polymers align FtsZ polymers for normal septum formation: SepF rings align FtsZ protofilaments. *EMBO J.* *30*, 617–626.
- Gurskaya, N.G., Verkhusha, V.V., Shcheglov, A.S., Staroverov, D.B., Chepurnykh, T.V., Fradkov, A.F., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2006). Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nat. Biotechnol.* *24*, 461–465.

- Gustafsson, M.G. (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* *198*, 82–87.
- Haeusser, D.P., and Levin, P.A. (2008). The Great Divide: Coordinating cell cycle events during bacterial growth and division. *Curr. Opin. Microbiol.* *11*, 94–99.
- Haeusser, D.P., Schwartz, R.L., Smith, A.M., Oates, M.E., and Levin, P.A. (2004). EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. *Mol. Microbiol.* *52*, 801–814.
- Haeusser, D.P., Lee, A.H., Weart, R.B., and Levin, P.A. (2009). ClpX inhibits FtsZ assembly in a manner that does not require its ATP hydrolysis-dependent chaperone activity. *J. Bacteriol.* *191*, 1986–1991.
- Halliburton, W.D. (1887). On Muscle-Plasma.
- Hamoen, L.W., Meile, J.-C., de Jong, W., Noirot, P., and Errington, J. (2006). SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. *Mol. Microbiol.* *59*, 989–999.
- Harry, E., Monahan, L., and Thompson, L. (2006). Bacterial Cell Division: The Mechanism and Its Precision. In *International Review of Cytology*, (Elsevier), pp. 27–94.
- Harz, H., Burgdorf, K., and Höltje, J.V. (1990). Isolation and separation of the glycan strands from murein of *Escherichia coli* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* *190*, 120–128.
- Håvarstein, L.S., Coomaraswamy, G., and Morrison, D.A. (1995). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 11140–11144.
- Håvarstein, L.S., Martin, B., Johnsborg, O., Granadel, C., and Claverys, J.-P. (2006). New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol. Microbiol.* *59*, 1297–1307.
- Heidrich, C., Templin, M.F., Ursinus, A., Merdanovic, M., Berger, J., Schwarz, H., De Pedro, M.A., and Höltje, J.-V. (2001). Involvement of N-acetylmuramyl-l-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *41*, 167–178.
- van Heijenoort, J. (2001). Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* *11*, 25R – 36R.
- van Heijenoort, J. (2011). Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *MMBR* *75*, 636–663.
- Hell, S.W. (2007). Far-Field Optical Nanoscopy. *Science* *316*, 1153–1158.
- Hess, S.T., Girirajan, T.P.K., and Mason, M.D. (2006). Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.* *91*, 4258–4272.

- Hirst, R.A., Gosai, B., Rutman, A., Guerin, C.J., Nicotera, P., Andrew, P.W., and O'Callaghan, C. (2008). Streptococcus pneumoniae deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis. *J. Infect. Dis.* *197*, 744–751.
- Holden, S.J., Pengo, T., Meibom, K.L., Fernandez Fernandez, C., Collier, J., and Manley, S. (2014). High throughput 3D super-resolution microscopy reveals Caulobacter crescentus in vivo Z-ring organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 4566–4571.
- Holečková, N., Doubravová, L., Massidda, O., Molle, V., Buriánková, K., Benada, O., Kofroňová, O., Ulrych, A., and Branny, P. (2015). LocZ is a new cell division protein involved in proper septum placement in Streptococcus pneumoniae. *mBio* *6*, e01700–e01714.
- Höltje, J.-V. (1998). Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of Escherichia coli. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 181–203.
- Hoyland, C.N., Aldridge, C., Cleverley, R.M., Duchêne, M.-C., Minasov, G., Onopriyenko, O., Sidiq, K., Stogios, P.J., Anderson, W.F., Daniel, R.A., et al. (2014). Structure of the LdcB LD-carboxypeptidase reveals the molecular basis of peptidoglycan recognition. *Struct. Lond. Engl.* *22*, 949–960.
- Hsin, J., Gopinathan, A., and Huang, K.C. (2012). Nucleotide-dependent conformations of FtsZ dimers and force generation observed through molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 9432–9437.
- Hu, Z., Mukherjee, A., Pichoff, S., and Lutkenhaus, J. (1999). The MinC component of the division site selection system in Escherichia coli interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 14819–14824.
- Huang, K.-H., Durand-Heredia, J., and Janakiraman, A. (2013). FtsZ Ring Stability: of Bundles, Tubules, Crosslinks, and Curves. *J. Bacteriol.* *195*, 1859–1868.
- Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J.M., Bax, K., and Brown, J.S. (2010). The Streptococcus pneumoniae capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect. Immun.* *78*, 704–715.
- Inoué, S. (1953). Polarization optical studies of the mitotic spindle. *Chromosoma* *5*, 487–500.
- Inoué, S., and Sato, H. (1967). Cell Motility by Labile Association of Molecules The nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement. *J. Gen. Physiol.* *50*, 259–292.
- Ishikawa, S., Kawai, Y., Hiramatsu, K., Kuwano, M., and 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*, 1364–1380.
- Jenkins, C., Samudrala, R., Anderson, I., Hedlund, B.P., Petroni, G., Michailova, N., Pinel, N., Overbeek, R., Rosati, G., and Staley, J.T. (2002). Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus Prostheco bacter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 17049–17054.

- Jennings, P.C., Cox, G.C., Monahan, L.G., and Harry, E.J. (2011). Super-resolution imaging of the bacterial cytokinetic protein FtsZ. *Micron Oxf. Engl.* 1993 *42*, 336–341.
- Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C.J., Braun, D., Baaske, P., and Duhr, S. (2011). Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev. Technol.* *9*, 342–353.
- Jiang, W., Saxena, A., Song, B., Ward, B.B., Beveridge, T.J., and Myneni, S.C.B. (2004). Elucidation of Functional Groups on Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Surfaces Using Infrared Spectroscopy. *Langmuir* *20*, 11433–11442.
- Johnsborg, O., and Håvarstein, L.S. (2009a). Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Rev.* *33*, 627–642.
- Johnsborg, O., and Håvarstein, L.S. (2009b). Pneumococcal LytR, a protein from the LytR-CpsA-Psr family, is essential for normal septum formation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* *191*, 5859–5864.
- Johnston, C., Campo, N., Bergé, M.J., Polard, P., and Claverys, J.-P. (2014). *Streptococcus pneumoniae*, le transformiste. *Trends Microbiol.* *22*, 113–119.
- Jones, L.J.F., Carballido-López, R., and Errington, J. (2001). Control of Cell Shape in Bacteria: Helical, Actin-like Filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* *104*, 913–922.
- Jysum, K. (1966). Genetic factors determining competence in transformation of *Neisseria meningitidis*. II. A reversible loss of competence. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* *67*, 493–502.
- Kausmally, L., Johnsborg, O., Lunde, M., Knutsen, E., and Håvarstein, L.S. (2005). Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis. *J. Bacteriol.* *187*, 4338–4345.
- Kawai, Y., Daniel, R.A., and Errington, J. (2009). Regulation of cell wall morphogenesis in *Bacillus subtilis* by recruitment of PBP1 to the MreB helix. *Mol. Microbiol.* *71*, 1131–1144.
- Kawai, Y., Marles-Wright, J., Cleverley, R.M., Emmins, R., Ishikawa, S., Kuwano, M., Heinz, N., Bui, N.K., Hoyland, C.N., Ogasawara, N., et al. (2011). A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins. *EMBO J.* *30*, 4931–4941.
- Kell, C.M., Sharma, U.K., Dowson, C.G., Town, C., Balganes, T.S., and Spratt, B.G. (1993). Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* *106*, 171–175.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* *10*, 845–858.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* *305*, 567–580.

- Kuru, E., Tekkam, S., Hall, E., Brun, Y.V., and Van Nieuwenhze, M.S. (2015). Synthesis of fluorescent D-amino acids and their use for probing peptidoglycan synthesis and bacterial growth in situ. *Nat. Protoc.* *10*, 33–52.
- Kyaw, M.H., Rose, C.E., Fry, A.M., Singleton, J.A., Moore, Z., Zell, E.R., Whitney, C.G., and Active Bacterial Core Surveillance Program of the Emerging Infections Program Network (2005). The influence of chronic illnesses on the incidence of invasive pneumococcal disease in adults. *J. Infect. Dis.* *192*, 377–386.
- Lacks, S., and Hotchkiss, R.D. (1960). Formation of amyloamylase after genetic transformation of pneumococcus. *Biochim. Biophys. Acta* *45*, 155–163.
- Land, A.D., and Winkler, M.E. (2011). The Requirement for Pneumococcal MreC and MreD Is Relieved by Inactivation of the Gene Encoding PBP1a. *J. Bacteriol.* *193*, 4166–4179.
- Land, A.D., Tsui, H.-C.T., Kocaoglu, O., Vella, S.A., Shaw, S.L., Keen, S.K., Sham, L.-T., Carlson, E.E., and Winkler, M.E. (2013). Requirement of essential Pbp2x and GpsB for septal ring closure in *Streptococcus pneumoniae* D39: Essential role of GpsB in pneumococcal division. *Mol. Microbiol.* *90*, 939–955.
- Lara, B., Rico, A.I., Petruzzelli, S., Santona, A., Dumas, J., Biton, J., Vicente, M., Mingorance, J., and Massidda, O. (2004). Cell division in cocci: localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein: FtsA in *Streptococcus pneumoniae* division. *Mol. Microbiol.* *55*, 699–711.
- Larsen, R.A., Cusumano, C., Fujioka, A., Lim-Fong, G., Patterson, P., and Pogliano, J. (2007). Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis*. *Genes Dev.* *21*, 1340–1352.
- Lee, S.F., Thompson, M.A., Schwartz, M.A., Shapiro, L., and Moerner, W.E. (2011). Super-resolution imaging of the nucleoid-associated protein HU in *Caulobacter crescentus*. *Biophys. J.* *100*, L31–L33.
- Lenarcic, R., Halbedel, S., Visser, L., Shaw, M., Wu, L.J., Errington, J., Marenduzzo, D., and Hamoen, L.W. (2009). Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *EMBO J.* *28*, 2272–2282.
- Letunic, I., and Bork, P. (2011). Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res.* *39*, W475–W478.
- Levin, P.A., Kurtser, I.G., and Grossman, A.D. (1999). Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 9642–9647.
- Li, Y., Hsin, J., Zhao, L., Cheng, Y., Shang, W., Huang, K.C., Wang, H.-W., and Ye, S. (2013). FtsZ Protofilaments Use a Hinge-Opening Mechanism for Constrictive Force Generation. *Science* *341*, 392–395.

- Li, Z., Trimble, M.J., Brun, Y.V., and Jensen, G.J. (2007). The structure of FtsZ filaments in vivo suggests a force-generating role in cell division. *EMBO J.* *26*, 4694–4708.
- van der Linden, M., Al-Lahham, A., Nicklas, W., and Reinert, R.R. (2009). Molecular Characterization of Pneumococcal Isolates from Pets and Laboratory Animals. *PLoS ONE* *4*, e8286.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., and Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* *42*, D490–D495.
- Löwe, J., and Amos, L.A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* *391*, 203–206.
- Lutkenhaus, J.F., Wolf-Watz, H., and Donachie, W.D. (1980). Organization of genes in the *ftsA-envA* region of the *Escherichia coli* genetic map and identification of a new *fts* locus (*ftsZ*). *J. Bacteriol.* *142*, 615–620.
- Ma, X., Ehrhardt, D.W., and Margolin, W. (1996). Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 12998–13003.
- Mackenzie, G.A., Leach, A.J., Carapetis, J.R., Fisher, J., and Morris, P.S. (2010). Epidemiology of nasopharyngeal carriage of respiratory bacterial pathogens in children and adults: cross-sectional surveys in a population with high rates of pneumococcal disease. *BMC Infect. Dis.* *10*, 304.
- Maggi, S., Massidda, O., Luzi, G., Fadda, D., Paolozzi, L., and Ghelardini, P. (2008). Division protein interaction web: identification of a phylogenetically conserved common interactome between *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Microbiol. Read. Engl.* *154*, 3042–3052.
- Magnan, D., and Bates, D. (2015). Regulation of DNA Replication Initiation by Chromosome Structure. *J. Bacteriol.* *197*, 3370–3377.
- Margolin, W. (2012). The Price of Tags in Protein Localization Studies. *J. Bacteriol.* *194*, 6369–6371.
- Martner, A., Skovbjerg, S., Paton, J.C., and Wold, A.E. (2009). *Streptococcus pneumoniae* autolysis prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines. *Infect. Immun.* *77*, 3826–3837.
- Massidda, O., Anderluzzi, D., Friedli, L., and Feger, G. (1998). Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* *144*, 3069–3078.

- Massidda, O., Nováková, L., and Vollmer, W. (2013). From models to pathogens: how much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division? *Environ. Microbiol.* *15*, 3133–3157.
- Matias, V.R.F., and Beveridge, T.J. (2006). Native cell wall organization shown by cryo-electron microscopy confirms the existence of a periplasmic space in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *188*, 1011–1021.
- Matias, V.R.F., and Beveridge, T.J. (2007). Cryo-electron microscopy of cell division in *Staphylococcus aureus* reveals a mid-zone between nascent cross walls. *Mol. Microbiol.* *64*, 195–206.
- Matias, V.R.F., and Beveridge, T.J. (2008). Lipoteichoic acid is a major component of the *Bacillus subtilis* periplasm. *J. Bacteriol.* *190*, 7414–7418.
- Matsui, T., Yamane, J., Mogi, N., Yamaguchi, H., Takemoto, H., Yao, M., and Tanaka, I. (2012). Structural reorganization of the bacterial cell-division protein FtsZ from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *68*, 1175–1188.
- Meeske, A.J., Sham, L.-T., Kimsey, H., Koo, B.-M., Gross, C.A., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z. (2015). MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 6437–6442.
- Meier, E.L., and Goley, E.D. (2014). Form and function of the bacterial cytokinetic ring. *Curr. Opin. Cell Biol.* *26*, 19–27.
- Mellroth, P., Daniels, R., Eberhardt, A., Rönnlund, D., Blom, H., Widengren, J., Normark, S., and Henriques-Normark, B. (2012). LytA, Major Autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, Requires Access to Nascent Peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* *287*, 11018–11029.
- Migocki, M.D., Freeman, M.K., Wake, R.G., and Harry, E.J. (2002). The Min system is not required for precise placement of the midcell Z ring in *Bacillus subtilis*. *EMBO Rep.* *3*, 1163–1167.
- Mills, M.F., Marquart, M.E., and McDaniel, L.S. (2007). Localization of PcsB of *Streptococcus pneumoniae* and Its Differential Expression in Response to Stress. *J. Bacteriol.* *189*, 4544–4546.
- Mingorance, J., Tadros, M., Vicente, M., González, J.M., Rivas, G., and Vélez, M. (2005). Visualization of Single *Escherichia coli* FtsZ Filament Dynamics with Atomic Force Microscopy. *J. Biol. Chem.* *280*, 20909–20914.
- Mohammadi, T., Ploeger, G.E.J., Verheul, J., Comvalius, A.D., Martos, A., Alfonso, C., van Marle, J., Rivas, G., and den Blaauwen, T. (2009). The GTPase Activity of *Escherichia coli* FtsZ Determines the Magnitude of the FtsZ Polymer Bundling by ZapA in Vitro. *Biochemistry (Mosc.)* *48*, 11056–11066.

- Mohri, H. (1968). Amino-acid Composition of “Tubulin” constituting Microtubules of Sperm Flagella. *Nature* 217, 1053–1054.
- Molina, R., González, A., Stelter, M., Pérez-Dorado, I., Kahn, R., Morales, M., Campuzano, S., Campillo, N.E., Mobashery, S., García, J.L., et al. (2009). Crystal structure of CbpF, a bifunctional choline-binding protein and autolysis regulator from *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO Rep.* 10, 246–251.
- Monahan, L.G., Liew, A.T.F., Bottomley, A.L., and Harry, E.J. (2014). Division site positioning in bacteria: one size does not fit all. *Front. Microbiol.* 5, 19.
- Monteiro, J.M., Fernandes, P.B., Vaz, F., Pereira, A.R., Tavares, A.C., Ferreira, M.T., Pereira, P.M., Veiga, H., Kuru, E., VanNieuwenhze, M.S., et al. (2015). Cell shape dynamics during the staphylococcal cell cycle. *Nat. Commun.* 6, 8055.
- Morgenstein, R.M., Bratton, B.P., Nguyen, J.P., Ouzounov, N., Shaevitz, J.W., and Gitai, Z. (2015). RodZ links MreB to cell wall synthesis to mediate MreB rotation and robust morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 12510–12515.
- Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003). Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol. Microbiol.* 50, 845–855.
- Morlot, C., Noirclerc-Savoye, M., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2004). The d,d-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 51, 1641–1648.
- Morlot, C., Pernot, L., Le Gouellec, A., Di Guilmi, A.M., Vernet, T., Dideberg, O., and Dessen, A. (2005). Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 280, 15984–15991.
- Morlot, C., Uehara, T., Marquis, K.A., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z. (2010). A highly coordinated cell wall degradation machine governs spore morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 24, 411–422.
- Morlot, C., Bayle, L., Jacq, M., Fleurie, A., Tourcier, G., Galisson, F., Vernet, T., Grangeasse, C., and Di Guilmi, A.M. (2013). Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in *Streptococcus pneumoniae* R6 morphogenesis. *Mol. Microbiol.* 90, 88–102.
- Moscoso, M., García, E., and López, R. (2006). Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J. Bacteriol.* 188, 7785–7795.
- Mukherjee, A., and Lutkenhaus, J. (1994). Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J. Bacteriol.* 176, 2754–2758.



- Mulder, E., and Woldringh, C.L. (1989). Actively replicating nucleoids influence positioning of division sites in *Escherichia coli* filaments forming cells lacking DNA. *J. Bacteriol.* *171*, 4303–4314.
- Münch, D., Roemer, T., Lee, S.H., Engeser, M., Sahl, H.G., and Schneider, T. (2012). Identification and in vitro analysis of the GatD/MurT enzyme-complex catalyzing lipid II amidation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* *8*, e1002509.
- Neuhaus, F.C., and Baddiley, J. (2003). A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of d-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *67*, 686–723.
- Neylon, C., Kralicek, A.V., Hill, T.M., and Dixon, N.E. (2005). Replication termination in *Escherichia coli*: structure and antihelicase activity of the Tus-Ter complex. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *MMBR* *69*, 501–526.
- Ng, W.-L., Kazmierczak, K.M., and Winkler, M.E. (2004). Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator. *Mol. Microbiol.* *53*, 1161–1175.
- Nogales, E., Downing, K.H., Amos, L.A., and Löwe, J. (1998). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat. Struct. Biol.* *5*, 451–458.
- Nordstrom, K., Bernander, R., and Dasgupta, S. (1991). The *Escherichia coli* cell cycle: one cycle or multiple independent processes that are co-ordinated? *Mol. Microbiol.* *5*, 769–774.
- Nováková, L., Sasková, L., Pallová, P., Janecek, J., Novotná, J., Ulrych, A., Echenique, J., Trombe, M.-C., and Branny, P. (2005). Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. *FEBS J.* *272*, 1243–1254.
- O'Brien, K.L., and Dagan, R. (2003). The potential indirect effect of conjugate pneumococcal vaccines. *Vaccine* *21*, 1815–1825.
- Osaki, M., Arcondéguy, T., Bastide, A., Touriol, C., Prats, H., and Trombe, M.-C. (2009). The StkP/PhpP Signaling Couple in *Streptococcus pneumoniae*: Cellular Organization and Physiological Characterization. *J. Bacteriol.* *191*, 4943–4950.
- Osawa, M., and Erickson, H.P. (2013). Liposome division by a simple bacterial division machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 11000–11004.
- Osawa, M., Anderson, D.E., and Erickson, H.P. (2008). Reconstitution of Contractile FtsZ Rings in Liposomes. *Science* *320*, 792–794.
- Pagliero, E., Dideberg, O., Vernet, T., and Di Guilmi, A.M. (2005). The PECACE domain: a new family of enzymes with potential peptidoglycan cleavage activity in Gram-positive bacteria. *BMC Genomics* *6*, 19.

- Pagliero, E., Dublet, B., Frehel, C., Dideberg, O., T, V., and Am, D.G. (2008). The Inactivation of a New Peptidoglycan Hydrolase Pmp23 Leads to Abnormal Septum Formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Open Microbiol. J.* *2*, 107–114.
- Paik, J., Kern, I., Lurz, R., and Hakenbeck, R. (1999). Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins. *J. Bacteriol.* *181*, 3852–3856.
- Pakula, R., and Walczak, W. (1963). On the nature of competence of transformable streptococci. *J. Gen. Microbiol.* *31*, 125–133.
- Pasteur, L. (1881). Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage.
- Patrick, J.E., and Kearns, D.B. (2008). MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *70*, 1166–1179.
- de Pedro, M.A., Quintela, J.C., Höltje, J.V., and Schwarz, H. (1997). Murein segregation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *179*, 2823–2834.
- Peppoloni, S., Colombari, B., Beninati, C., Felici, F., Teti, G., Speziale, P., Ricci, S., Ardizzoni, A., Manca, L., and Blasi, E. (2013). The Spr1875 protein confers resistance to the microglia-mediated killing of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Pathog.* *59–60*, 42–47.
- Pérez-Dorado, I., González, A., Morales, M., Sanles, R., Striker, W., Vollmer, W., Mobashery, S., García, J.L., Martínez-Ripoll, M., García, P., et al. (2010). Insights into pneumococcal fratricide from the crystal structures of the modular killing factor LytC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 576–581.
- Perry, S.E., and Edwards, D.H. (2006). The *Bacillus subtilis* DivIVA Protein Has a Sporulation-Specific Proximity to Spo0J. *J. Bacteriol.* *188*, 6039–6043.
- Pestova, E.V., Håvarstein, L.S., and Morrison, D.A. (1996). Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol. Microbiol.* *21*, 853–862.
- Philippe, J., Vernet, T., and Zapun, A. (2014). The Elongation of *Ovococci*. *Microb. Drug Resist.* *20*, 215–221.
- Philippe, J., Gallet, B., Morlot, C., Denapaité, D., Hakenbeck, R., Chen, Y., Vernet, T., and Zapun, A. (2015). Mechanism of  $\beta$ -lactam action in *Streptococcus pneumoniae*: the piperacillin paradox. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 609–621.
- Pichoff, S., and Lutkenhaus, J. (2005). Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol. Microbiol.* *55*, 1722–1734.
- Pilhofer, M., Aistleitner, K., Biboy, J., Gray, J., Kuru, E., Hall, E., Brun, Y.V., VanNieuwenhze, M.S., Vollmer, W., Horn, M., et al. (2013). Discovery of chlamydial peptidoglycan reveals bacteria with murein sacculi but without FtsZ. *Nat. Commun.* *4*, 2856.

- van der Ploeg, R., Verheul, J., Vischer, N.O.E., Alexeeva, S., Hoogendoorn, E., Postma, M., Banzhaf, M., Vollmer, W., and den Blaauwen, T. (2013). Colocalization and interaction between elongasome and divisome during a preparative cell division phase in *Escherichia coli*: Preparing cell division. *Mol. Microbiol.* *87*, 1074–1087.
- Potluri, L.-P., Kannan, S., and Young, K.D. (2012). ZipA Is Required for FtsZ-Dependent Preseptal Peptidoglycan Synthesis prior to Invagination during Cell Division. *J. Bacteriol.* *194*, 5334–5342.
- Pribyl, T., Moche, M., Dreisbach, A., Bijlsma, J.J.E., Saleh, M., Abdullah, M.R., Hecker, M., van Dijl, J.M., Becher, D., and Hammerschmidt, S. (2014). Influence of impaired lipoprotein biogenesis on surface and exoproteome of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Proteome Res.* *13*, 650–667.
- Priyadarshini, R., de Pedro, M.A., and Young, K.D. (2007). Role of peptidoglycan amidases in the development and morphology of the division septum in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *189*, 5334–5347.
- Ramadurai, L., and Jayaswal, R.K. (1997). Molecular cloning, sequencing, and expression of *lytM*, a unique autolytic gene of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *179*, 3625–3631.
- Ramamurthi, K.S., and Losick, R. (2009). Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 13541–13545.
- Ramos-Sevillano, E., Urzainqui, A., Campuzano, S., Moscoso, M., González-Camacho, F., Domenech, M., Rodríguez de Córdoba, S., Sánchez-Madrid, F., Brown, J.S., García, E., et al. (2015). Pleiotropic effects of cell wall amidase *LytA* on *Streptococcus pneumoniae* sensitivity to the host immune response. *Infect. Immun.* *83*, 591–603.
- Reichmann, N.T., Piçarra Cassona, C., Monteiro, J.M., Bottomley, A.L., Corrigan, R.M., Foster, S.J., Pinho, M.G., and Gründling, A. (2014). Differential localization of LTA synthesis proteins and their interaction with the cell division machinery in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* *92*, 273–286.
- Reinscheid, D.J., Gottschalk, B., Schubert, A., Eikmanns, B.J., and Chhatwal, G.S. (2001). Identification and molecular analysis of *PcsB*, a protein required for cell wall separation of group B streptococcus. *J. Bacteriol.* *183*, 1175–1183.
- Reyes-Lamothe, R., Wang, X., and Sherratt, D. (2008). *Escherichia coli* and its chromosome. *Trends Microbiol.* *16*, 238–245.
- Rico-Lastres, P., Díez-Martínez, R., Iglesias-Bexiga, M., Bustamante, N., Aldridge, C., Heseck, D., Lee, M., Mobashery, S., Gray, J., Vollmer, W., et al. (2015). Substrate recognition and catalysis by *LytB*, a pneumococcal peptidoglycan hydrolase involved in virulence. *Sci. Rep.* *5*, 16198.

- Royet, J., and Dziarski, R. (2007). Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 264–277.
- Rueda, S., Vicente, M., and Mingorance, J. (2003). Concentration and Assembly of the Division Ring Proteins FtsZ, FtsA, and ZipA during the *Escherichia coli* Cell Cycle. *J. Bacteriol.* *185*, 3344–3351.
- Ruiz, N. (2008). Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 15553–15557.
- Rust, M.J., Bates, M., and Zhuang, X. (2006). Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* *3*, 793–795.
- Sage, D., Kirshner, H., Pengo, T., Stuurman, N., Min, J., Manley, S., and Unser, M. (2015). Quantitative evaluation of software packages for single-molecule localization microscopy. *Nat. Methods* *12*, 717–724.
- Sanchez-Puelles, J.M., Ronda, C., Garcia, J.L., Garcia, P., Lopez, R., and Garcia, E. (1986). Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur. J. Biochem. FEBS* *158*, 289–293.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 234–258.
- Schirner, K., Eun, Y.-J., Dion, M., Luo, Y., Helmann, J.D., Garner, E.C., and Walker, S. (2015). Lipid-linked cell wall precursors regulate membrane association of bacterial actin MreB. *Nat. Chem. Biol.* *11*, 38–45.
- Schleifer, K.H., and Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* *36*, 407–477.
- Schlieper, D., Oliva, M.A., Andreu, J.M., and Löwe, J. (2005). Structure of bacterial tubulin BtubA/B: Evidence for horizontal gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 9170–9175.
- Schuster, C., Dobrinski, B., and Hakenbeck, R. (1990). Unusual septum formation in *Streptococcus pneumoniae* mutants with an alteration in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3. *J. Bacteriol.* *172*, 6499–6505.
- Senadheera, D.B., Cordova, M., Ayala, E.A., Paz, L.E.C. de, Singh, K., Downey, J.S., Svensäter, G., Goodman, S.D., and Cvitkovitch, D.G. (2012). Regulation of Bacteriocin Production and Cell Death by the VicRK Signaling System in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* *194*, 1307–1316.
- Senadheera, M.D., Guggenheim, B., Spatafora, G.A., Huang, Y.-C.C., Choi, J., Hung, D.C.I., Treglown, J.S., Goodman, S.D., Ellen, R.P., and Cvitkovitch, D.G. (2005). A VicRK Signal

Transduction System in *Streptococcus mutans* Affects *gtfBCD*, *gbpB*, and *ftf* Expression, Biofilm Formation, and Genetic Competence Development. *J. Bacteriol.* *187*, 4064–4076.

Seo, H.S., Cartee, R.T., Pritchard, D.G., and Nahm, M.H. (2008). A New Model of Pneumococcal Lipoteichoic Acid Structure Resolves Biochemical, Biosynthetic, and Serologic Inconsistencies of the Current Model. *J. Bacteriol.* *190*, 2379–2387.

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

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

Shen, B., and Lutkenhaus, J. (2009). The conserved C-terminal tail of FtsZ is required for the septal localization and division inhibitory activity of MinC(C)/MinD. *Mol. Microbiol.* *72*, 410–424.

Shivanandan, A., Deschout, H., Scarselli, M., and Radenovic, A. (2014). Challenges in quantitative single molecule localization microscopy. *FEBS Lett.* *588*, 3595–3602.

Shockman, G.D., and Slade, H.D. (1964). The Cellular Location of the Streptococcal Group D Antigen. *J. Gen. Microbiol.* *37*, 297–305.

Si, F., Busiek, K., Margolin, W., and Sun, S.X. (2013). Organization of FtsZ Filaments in the Bacterial Division Ring Measured from Polarized Fluorescence Microscopy. *Biophys. J.* *105*, 1976–1986.

Silvestroni, A., Jewell, K.A., Lin, W.-J., Connelly, J.E., Ivancic, M.M., Tao, W.A., and Rajagopal, L. (2009). Identification of serine/threonine kinase substrates in the human pathogen group B streptococcus. *J. Proteome Res.* *8*, 2563–2574.

Singh, J.K., Makde, R.D., Kumar, V., and Panda, D. (2007). A membrane protein, EzrA, regulates assembly dynamics of FtsZ by interacting with the C-terminal tail of FtsZ. *Biochemistry (Mosc.)* *46*, 11013–11022.

Singh, J.K., Makde, R.D., Kumar, V., and Panda, D. (2008). SepF increases the assembly and bundling of FtsZ polymers and stabilizes FtsZ protofilaments by binding along its length. *J. Biol. Chem.* *283*, 31116–31124.

Skov Sørensen, U.B., Blom, J., Birch-Andersen, A., and Henriksen, J. (1988). Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. *Infect. Immun.* *56*, 1890–1896.

Smith, T.J., Blackman, S.A., and Foster, S.J. (2000). Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiol. Read. Engl.* *146 (Pt 2)*, 249–262.

- Solomon, J.M., and Grossman, A.D. (1996). Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends Genet.* *12*, 150–155.
- Sørensen, U.B.S., Henrichsen, J., Chen, H.-C., and Szu, S.C. (1990). Covalent linkage between the capsular polysaccharide and the cell wall peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae* revealed by immunochemical methods. *Microb. Pathog.* *8*, 325–334.
- Steele, V.R., Bottomley, A.L., Garcia-Lara, J., Kasturiarachchi, J., and Foster, S.J. (2011). Multiple essential roles for EzrA in cell division of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* *80*, 542–555.
- Sternberg, G. (1881). A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. .
- Strauss, M.P., Liew, A.T.F., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Monahan, L.G., and Harry, E.J. (2012). 3D-SIM Super Resolution Microscopy Reveals a Bead-Like Arrangement for FtsZ and the Division Machinery: Implications for Triggering Cytokinesis. *PLoS Biol.* *10*, e1001389.
- Stricker, J., Maddox, P., Salmon, E.D., and Erickson, H.P. (2002). Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 3171–3175.
- Sugimoto, S., Yamanaka, K., Nishikori, S., Miyagi, A., Ando, T., and Ogura, T. (2010). AAA+ chaperone ClpX regulates dynamics of prokaryotic cytoskeletal protein FtsZ. *J. Biol. Chem.* *285*, 6648–6657.
- Sung, C.K., Li, H., Claverys, J.P., and Morrison, D.A. (2001). An *rpsL* Cassette, Janus, for Gene Replacement through Negative Selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 5190–5196.
- Szent-Györgyi, A.G. (2004). The Early History of the Biochemistry of Muscle Contraction. *J. Gen. Physiol.* *123*, 631–641.
- Szwedziak, P., Wang, Q., Freund, S.M., and Löwe, J. (2012). FtsA forms actin-like protofilaments. *EMBO J.* *31*, 2249–2260.
- Szwedziak, P., Wang, Q., Bharat, T.A.M., Tsim, M., and Löwe, J. (2014). Architecture of the ring formed by the tubulin homologue FtsZ in bacterial cell division. *eLife* *3*, e04601.
- Tanaka, K.A.K., Suzuki, K.G.N., Shirai, Y.M., Shibutani, S.T., Miyahara, M.S.H., Tsuboi, H., Yahara, M., Yoshimura, A., Mayor, S., Fujiwara, T.K., et al. (2010). Membrane molecules mobile even after chemical fixation. *Nat. Methods* *7*, 865–866.
- Thorley, J.A., Pike, J., and Rappoport, J.Z. (2014). Chapter 14 - Super-resolution Microscopy: A Comparison of Commercially Available Options A2 - Cornea, Anda. In *Fluorescence Microscopy*, P.M. Conn, ed. (Boston: Academic Press), pp. 199–212.

- Tinsley, E., and Khan, S.A. (2006). A Novel FtsZ-Like Protein Is Involved in Replication of the Anthrax Toxin-Encoding pXO1 Plasmid in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* *188*, 2829–2835.
- Tomasz, A. (1967). Choline in the Cell Wall of a Bacterium: Novel Type of Polymer-Linked Choline in *Pneumococcus*. *Science* *157*, 694–697.
- Tomasz, A. (1968). Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of *Pneumococcus*: chitin formation, loss of transformability, and loss of autolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *59*, 86–93.
- Tomasz, A., and Waks, S. (1975). Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 4162–4166.
- Tonthat, N.K., Milam, S.L., Chinnam, N., Whitfill, T., Margolin, W., and Schumacher, M.A. (2013). SlmA forms a higher-order structure on DNA that inhibits cytokinetic Z-ring formation over the nucleoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 10586–10591.
- Toro, E., and Shapiro, L. (2010). *Bacterial Chromosome Organization and Segregation*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *2*.
- Trueba, F.J. (1982). On the precision and accuracy achieved by *Escherichia coli* cells at fission about their middle. *Arch. Microbiol.* *131*, 55–59.
- Tsui, H.-C.T., Boersma, M.J., Vella, S.A., Kocaoglu, O., Kuru, E., Peceny, J.K., Carlson, E.E., VanNieuwenhze, M.S., Brun, Y.V., Shaw, S.L., et al. (2014). Pbp2x localizes separately from Pbp2b and other peptidoglycan synthesis proteins during later stages of cell division of *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* *94*, 21–40.
- Uehara, T., Parzych, K.R., Dinh, T., and Bernhardt, T.G. (2010). Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis. *EMBO J.* *29*, 1412–1422.
- Van De Putte, P., Van Dillewijn, null, and Roersch, A. (1964). The selection of mutants of *Escherichia coli* with impaired cell division at elevated temperature. *Mutat. Res.* *106*, 121–128.
- Varma, A., and Young, K.D. (2009). In *Escherichia coli*, MreB and FtsZ direct the synthesis of lateral cell wall via independent pathways that require PBP 2. *J. Bacteriol.* *191*, 3526–3533.
- Vedyaykin, A.D., Vishnyakov, I.E., Polinovskaya, V.S., Khodorkovskii, M.A., and Sabantsev, A.V. (2016). New insights into FtsZ rearrangements during the cell division of *Escherichia coli* from single-molecule localization microscopy of fixed cells. *MicrobiologyOpen*.
- Vesth, T., Ozen, A., Andersen, S.C., Kaas, R.S., Lukjancenko, O., Bohlin, J., Nookaew, I., Wassenaar, T.M., and Ussery, D.W. (2013). *Veillonella*, Firmicutes: Microbes disguised as Gram negatives. *Stand. Genomic Sci.* *9*, 431–448.

- Veyrier, F.J., Williams, A.H., Mesnage, S., Schmitt, C., Taha, M.-K., and Boneca, I.G. (2013). De-O-acetylation of peptidoglycan regulates glycan chain extension and affects in vivo survival of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* *87*, 1100–1112.
- Vinogradov, E., Sadvskaya, I., Li, J., and Jabbouri, S. (2006). Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus aureus* MN8m, a biofilm forming strain. *Carbohydr. Res.* *341*, 738–743.
- Vollmer, W. (2008). Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 287–306.
- Vollmer, W., and Höltje, J.-V. (2004). The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? *J. Bacteriol.* *186*, 5978–5987.
- Vollmer, W., and Tomasz, A. (2000). The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* *275*, 20496–20501.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S. (2008a). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 259–286.
- Vollmer, W., Blanot, D., and de Pedro, M.A. (2008b). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 149–167.
- Wang, S., Moffitt, J.R., Dempsey, G.T., Xie, X.S., and Zhuang, X. (2014). Characterization and development of photoactivatable fluorescent proteins for single-molecule-based superresolution imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 8452–8457.
- Wang, W., Li, G.-W., Chen, C., Xie, X.S., and Zhuang, X. (2011). Chromosome organization by a nucleoid-associated protein in live bacteria. *Science* *333*, 1445–1449.
- Watson, D.A., Musher, D.M., Jacobson, J.W., and Verhoef, J. (1993). A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *17*, 913–924.
- Weadge, J.T., and Clarke, A.J. (2006). Identification and Characterization of O-Acetylpeptidoglycan Esterase: A Novel Enzyme Discovered in *Neisseria gonorrhoeae*†. *Biochemistry (Mosc.)* *45*, 839–851.
- Weart, R.B., Nakano, S., Lane, B.E., Zuber, P., and Levin, P.A. (2005). The ClpX chaperone modulates assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Mol. Microbiol.* *57*, 238–249.
- Weidenmaier, C., and Peschel, A. (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 276–287.
- Weisenberg, R.C., Borisy, G.G., and Taylor, E.W. (1968). The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *Biochemistry (Mosc.)* *7*, 4466–4479.



- Wheeler, R., Mesnage, S., Boneca, I.G., Hobbs, J.K., and Foster, S.J. (2011). Super-resolution microscopy reveals cell wall dynamics and peptidoglycan architecture in ovococcal bacteria. *Mol. Microbiol.* 82, 1096–1109.
- Whelan, D.R., and Bell, T.D.M. (2015). Image artifacts in single molecule localization microscopy: why optimization of sample preparation protocols matters. *Sci. Rep.* 5, 7924.
- Winkler, M.E., and Hoch, J.A. (2008). Essentiality, Bypass, and Targeting of the YycFG (VicRK) Two-Component Regulatory System in Gram-Positive Bacteria. *J. Bacteriol.* 190, 2645–2648.
- Winslow, C.E., Broadhurst, J., Buchanan, R.E., Krumwiede, C., Rogers, L.A., and Smith, G.H. (1920). The Families and Genera of the Bacteria: Final Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. *J. Bacteriol.* 5, 191–229.
- Wu, L.J., and Errington, J. (1994). *Bacillus subtilis* SpoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. *Science* 264, 572–575.
- Wu, L.J., and Errington, J. (2004). Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* 117, 915–925.
- Wu, L.J., Ishikawa, S., Kawai, Y., Oshima, T., Ogasawara, N., and Errington, J. (2009). Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *EMBO J.* 28, 1940–1952.
- Wyatt, P.J. (1970). Cell Wall Thickness, Size Distribution, Refractive Index Ratio and Dry Weight Content of Living Bacteria (*Staphylococcus aureus*). *Nature* 226, 277–279.
- Xu, Q., Chiu, H.-J., Farr, C.L., Jaroszewski, L., Knuth, M.W., Miller, M.D., Lesley, S.A., Godzik, A., Elsliger, M.-A., Deacon, A.M., et al. (2014). Structures of a bifunctional cell wall hydrolase CwlT containing a novel bacterial lysozyme and an NlpC/P60 DL-endopeptidase. *J. Mol. Biol.* 426, 169–184.
- Yao, X., Jericho, M., Pink, D., and Beveridge, T. (1999). Thickness and elasticity of gram-negative murein sacculi measured by atomic force microscopy. *J. Bacteriol.* 181, 6865–6875.
- Yeats, C., Finn, R.D., and Bateman, A. (2002). The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem. Sci.* 27, 438.
- Yunck, R., Cho, H., and Bernhardt, T.G. (2015). Identification of MltG as a potential terminase for peptidoglycan polymerization in bacteria. *Mol. Microbiol.*
- Zapun, A., Philippe, J., Abrahams, K.A., Signor, L., Roper, D.I., Breukink, E., and Vernet, T. (2013). In vitro reconstitution of peptidoglycan assembly from the Gram-positive pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *ACS Chem. Biol.* 8, 2688–2696.

Zhou, H., and Lutkenhaus, J. (2005). MinC mutants deficient in MinD- and DicB-mediated cell division inhibition due to loss of interaction with MinD, DicB, or a septal component. *J. Bacteriol.* *187*, 2846–2857.

Zhou, X., Halladin, D.K., Rojas, E.R., Koslover, E.F., Lee, T.K., Huang, K.C., and Theriot, J.A. (2015). Bacterial division. Mechanical crack propagation drives millisecond daughter cell separation in *Staphylococcus aureus*. *Science* *348*, 574–578.



# Résumé

---

La division bactérienne résulte de la constriction de la membrane, menée par la protéine du cytosquelette FtsZ, et de l'expansion et du remodelage de la paroi, réalisés par des synthétases et des hydrolases de la paroi. La coordination de ces processus au sein d'un macrocomplexe protéique, le divisome, est nécessaire au maintien de la forme et de l'intégrité bactérienne. J'ai étudié deux aspects importants de ce mécanisme de coordination chez le pathogène humain *Streptococcus pneumoniae*. J'ai déterminé *in vivo* la nanostructure de la protéine FtsZ en développant l'utilisation du PALM (PhotoActivated Localization Microscopy) chez le pneumocoque. Cette technique, basée sur la détection de molécules uniques et permettant une résolution de 20-40 nm, a révélé des aspects inattendus (dimensions, amas, sous-structures) de l'architecture de l'anneau de FtsZ au cours du cycle cellulaire. En parallèle, j'ai étudié le rôle de l'hydrolase Pmp23 par génétique, biochimie et microscopie à fluorescence. Mon travail a montré que Pmp23 est requise pour la stabilité des macrostructures du divisome du pneumocoque, révélant une nouvelle connexion entre le métabolisme de la paroi et la division cellulaire.

# Summary

---

Bacterial division results from the combination of membrane constriction, driven by the cytoskeletal protein FtsZ, with cell wall expansion and remodeling, performed by cell wall synthases and hydrolases. Coordination of these processes within a large protein complex known as the divisome ensures cell integrity and maintenance of cell shape. I have investigated two important aspects of this coordination mechanism in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. I determined the *in vivo* nanostructure of the divisome scaffolding protein FtsZ by developing the use of PhotoActivated Localization Microscopy (PALM) in the pneumococcus. PALM, which is based on the detection of single fluorescent labels and allows 20-40 nm resolution, has revealed unexpected features (dimensions, clusters, new substructures) of the FtsZ-ring architecture along the cell cycle. In parallel, I studied the role of the cell wall hydrolase Pmp23 using genetics, biochemistry and fluorescence microscopy. My work has shown that Pmp23 is required for the stability of divisome macrostructures in the pneumococcal cell, revealing a new connection between cell wall metabolism and cell division.