



**HAL**  
open science

# Caractérisation d'une nouvelle Tyrosine protéine-kinase et étude de son rôle cellulaire chez la bactérie *Streptococcus pneumoniae*

Anaïs Pelletier

► **To cite this version:**

Anaïs Pelletier. Caractérisation d'une nouvelle Tyrosine protéine-kinase et étude de son rôle cellulaire chez la bactérie *Streptococcus pneumoniae*. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1125 . tel-03879644

**HAL Id: tel-03879644**

**<https://theses.hal.science/tel-03879644v1>**

Submitted on 30 Nov 2022

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

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



N°d'ordre NNT : 2021LYSE1125

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale** N° accréditation 205  
**ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE**

**Spécialité de doctorat** : Sciences Expérimentales  
**Discipline** : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Soutenue publiquement le 15/07/2021, par :  
**Anaïs PELLETIER**

---

# **Caractérisation d'une nouvelle Tyrosine protéine-kinase et étude de son rôle cellulaire chez la bactérie *Streptococcus pneumoniae***

---

Directeur de thèse : Dr. Jean-Pierre LAVERGNE  
Co-directeur de thèse : Dr. Sébastien GUIRAL

Devant le jury composé de :

Pr. DOUBLET Patricia  
Dr. BERGE Mathieu  
Dr. GALINIER Anne  
Dr. TARDY Florence  
Dr. GRANGEASSE Christophe  
Dr. LAVERGNE Jean-Pierre  
Dr. GUIRAL Sébastien

Pr. UCBL  
MdC TLSE3  
DR CNRS  
CR ANSES  
DR CNRS  
CR CNRS  
MdC UCBL

Présidente  
Rapporteur  
Rapporteuse  
Examinatrice  
Examineur  
Examineur  
Invité



## **UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1**

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-présidente de la Commission de la formation et de la Vie Universitaire	Mme Céline BROCHIER
Vice-président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

### **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directrice : Mme Carole BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISPB)	Directrice Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

### **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

UFR Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
Département Génie Electrique et des procédés (GEP)	Administratrice provisoire : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Administrateur provisoire : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Administrateur provisoire : M. Marc BUFFAT
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytech Lyon	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1 (IUT)	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National Supérieure du Professorat et de l'Education (INSPé)	Directeur : M. Pierre CHAREYR



**Titre :** Caractérisation d'une nouvelle Tyrosine protéine-kinase et étude de son rôle cellulaire chez la bactérie *Streptococcus pneumoniae*

**Résumé :** La bactérie pathogène *Streptococcus pneumoniae* possède deux protéine-kinases CpsD et StkP impliquées respectivement dans la synthèse de la capsule polysaccharidique et de la division cellulaire. Récemment, une nouvelle famille de protéine-kinases exclusivement bactérienne a été identifiée, nommée UbK (*Ubiquitous bacterial Kinase*). Mes travaux de thèse ont consisté en l'étude du rôle cellulaire d'UbK chez le pneumocoque. J'ai montré qu'UbK s'autophosphoryle sur une unique Tyrosine *in vivo*. Un mutant  $\Delta ubk$  présente des défauts de croissance et de morphologie. Nous avons mis en évidence que l'absence d'activité d'hydrolyse de l'ATP ou une phosphorylation permanente sont également délétères pour la croissance et la morphologie cellulaires. La délétion d'*ubk* sélectionne une mutation suppressive dans la protéine essentielle AsnS, dont le rôle est assimilé à une Asparaginyl-ARNt synthétase. J'ai exploré le lien entre UbK et AsnS. *ubk* est présent dans un opéron de gènes induits lors de la compétence. J'ai mis en évidence que la compétence tardive et la transformation étaient en partie contrôlées par UbK. Les défauts de morphologie en absence d'*ubk* traduisent une altération du cycle cellulaire. Nous avons déterminé que la composition de la paroi était modifiée, et que les protéines de la division FtsZ et FtsA, des partenaires d'UbK, ne sont pas localisées correctement dans le mutant  $\Delta ubk$ . UbK est donc un acteur majeur de la division cellulaire et de la compétence.

**Mots clés :** *Streptococcus pneumoniae*, croissance cellulaire, morphogénèse bactérienne, protéine-kinase, compétence, division cellulaire, suppresseur

---

**Title :** Characterization of a new Tyrosine protein-kinase and study of its cellular role in the bacterium *Streptococcus pneumoniae*

**Summary :** The pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae* possesses two protein-kinases CpsD and StkP involved in polysaccharide capsule synthesis and cellular division respectively. Recently, a new bacterial protein-kinase family was identified, named UbK (*Ubiquitous bacterial Kinase*). My thesis work was to study the cellular role of UbK in the pneumococcus. I have demonstrated that Ubk is phosphorylated on a unique Tyrosine *in vivo*. A  $\Delta ubk$  mutant, as well as catalytic (non ATPasic) or a permanently phosphorylated mutant shows growth and morphological defects. The deletion of *ubk* generates a suppressive mutation in the essential protein AsnS, whose role is assimilated to Asparaginyl-tRNA synthetase. Thus, I explored in details the link between UbK and AsnS. *ubk* is found in an operon induced in competence. I have evidenced that late competence and transformation are to a certain extent controlled by UbK. Morphological defects in absence of *ubk* appear to be typical of a cell-cycle impairment. We determined the cell wall composition was impaired, and that the UbK's partners, FtsZ and FtsA that are implicated in cell division, are not correctly localized the  $\Delta ubk$  mutant. Therefore, UbK is a major actor of cellular division and competence.

**Keywords :** *Streptococcus pneumoniae*, cellular growth, bacterial morphogenesis, protein-kinase, competence, cellular division, suppressor

---

INSTITUT ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratory of Molecular Microbiology and Structural Biochemistry - UMR 5086 - CNRS /  
Bâtiment IBCP, 7, passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 07, France



A ma famille,





## Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés dans l'équipe « Bactéries Pathogènes et Phosphorylation des Protéines » du Dr Christophe Grangeasse, au sein de l'unité « Molecular Microbiology and Structural Biochemistry » (UMR5086) à Lyon, sous la direction scientifique de Jean-Pierre Lavergne et Sébastien Guiral.

Je remercie tout particulièrement le Dr Mathieu Bergé et le Dr Anne Galinier de l'honneur qu'ils me font de juger mon travail de thèse. Je remercie également le Pr Patricia Doublet d'avoir accepté de présider ce jury, et le Dr Florence Tardy de l'intérêt porté à ce travail en acceptant de participer à ce jury de thèse.

Je tiens également à remercier Laetitia Attaeich et Cédric Orelle d'avoir participé à mon comité de thèse, pour vos remarques constructives, vos encouragements et vos conseils.

Je remercie l'ensemble de nos collaborateurs pour leur expertise scientifique et technique : Virginie Gueguen-Chaignon pour sa dynamique et sa disponibilité pour les gels filtrations notamment et ses conseils en DLS, Eric pour sa bonne humeur et les lyophilisations de PG, Adeline Page et Frédéric Delolme pour leur sympathie et leur expertise en spectrométrie de masse sur la plateforme « Protein Science Facility » à Lyon, Caroline Cluzel-Grangeasse pour ses conseils sur les préparations d'échantillons et pour les séances de microscopie électronique au « Centre Technologique des Microstructures » de Lyon, Marie-Pierre Chapot-Chartier pour l'analyse de la composition de la paroi à Micalis à Paris, ainsi que Nathalie Campo du « Centre de Biologie Intégrative » de Toulouse pour ses précieux conseils et les divers outils fournis pour étudier la compétence.

Je remercie infiniment Christophe Grangeasse, qui m'a accueillie dans son laboratoire au long de ces 4 années de thèse, et même plus, avec les stages de master. Ta passion et ton dynamisme sont une source d'inspiration qui donnent toujours envie d'aller plus loin. Merci de m'avoir montré le fabuleux monde de la science, et de m'avoir fait découvrir le partage du savoir scientifique. Je te remercie également de m'avoir soutenue, et pour ton sens du détail qui m'a aidé à progresser dans mes synthèses.

Je tiens également à remercier chaleureusement Sébastien Guiral, qui a toujours eu confiance en mon travail, et m'a toujours soutenue et rassurée quelques soient les situations. Merci également de m'avoir aidé à canaliser mes idées et mon travail, ainsi qu'à être plus synthétique. Je te remercie pour ta patience et tes conseils, mais aussi pour ton humour et ta force tranquille, qui m'ont été précieux tout au long de cette thèse. Mais aussi, merci de m'avoir fait découvrir l'enseignement par ton dévouement et ton encouragement pour cette 4<sup>ème</sup> année, qui aura été une expérience intéressante. Merci également pour ton expertise sur la génétique du pneumocoque et la compétence, qui auront été très utiles pour mon sujet de thèse.

Je remercie tout particulièrement les membres de l'équipe, qui ont rendu cette thèse très enrichissante sur le plan professionnel et personnel. Je remercie Adrien pour son expertise et ses conseils sur la microscopie, mais aussi pour le développement de supers outils très utiles au cours de ma thèse. Merci de m'avoir fait découvrir une cuisine alternative, qui m'a parfois agréablement surprise. Je remercie également Stéphanie pour ses connaissances en biologie structurale et en biochimie, mais aussi pour tes conseils sur l'enseignement. Je te remercie pour ta disponibilité et ton enthousiasme au laboratoire, mais aussi pour nous avoir informé des nouvelles actualités du quotidien. JP, je te remercie pour tes conseils sur la biochimie et pour toutes les demandes que nous t'avons faites au laboratoire dont tu t'es occupé. Je te remercie aussi pour nos discussions sur ma région, que tu connaissais un peu plus que d'autres, et les balades en motos sympathiques à réaliser. Je remercie également Sathya et Nikos, de m'avoir fait découvrir de nouvelles cultures et nouveaux plats culinaires, mais aussi pour votre intérêt pour la science qui m'a permis d'apprendre pleins de nouvelles choses. Céline, avant toute chose, je te remercie d'être une lab manager fabuleuse, extrêmement bien organisée, patiente et pédagogue. Ça a été un véritable plaisir de partager ces années de thèse avec toi, de pouvoir parler de tout et de rien, de ton soutien quelques-soient les situations, mais aussi d'avoir pu te connaître (et je ne compte pas m'arrêter là !). Je remercie les petits nouveaux, Cassandra et Linus, d'apporter de nouvelles idées, pour nos discussions professionnelles ou extra-professionnelles. Je tiens à remercier tout particulièrement Cassandra pour sa bonne humeur, sa générosité et ses talents culinaires ; la relève du goûter est assurée ! Merci également pour la confiance dont j'ai pu te faire preuve au laboratoire. Je tiens également à remercier Chantal, d'avoir assuré toutes nos demandes de milieux pendant toutes ces années, ce qui nous a permis de gagner un temps considérable ! Merci aussi pour ta bonne humeur au quotidien et ta générosité.

Bien qu'ils ne soient plus là, je garde une pensée pour les anciens thésards du labo. Marine, je te remercie d'avoir contribué à la verdure du labo, sans toutefois en être allé jusqu'à la jungle ! Je te remercie pour ton humour (notamment sur ma taille) et tes « gifs » toujours plus originaux. Chryslène, je te remercie également pour l'exemple que tu as pu me fournir au laboratoire ; ta force de travail, ta rigueur, ta générosité, mais aussi ton sens du style ! Merci d'avoir toujours répondu à mes questions et de m'avoir soutenue. A toute les deux je vous souhaite tout pleins de bonnes choses pour la suite.

Je remercie également les personnes que j'ai pu croiser au laboratoire sur une courte période mais qui m'ont donné de précieux conseils techniques : Nelly, Sylvie et Laure, mais aussi Pierre pour sa bonne humeur communicative. Merci aussi à Mélisse pour ses anectodes toujours plus originales.

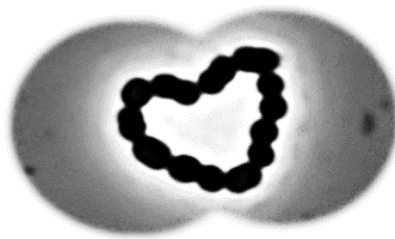
Je tiens à remercier l'ensemble des doctorants, pour leur soutien et leurs moments de partages conviviaux. Je remercie tout particulièrement Maty et Véronica qui ont partagés mon aventure depuis le master, Léa pour nos séances de décompression à la salle de sport, Morgane pour nos séances de microscopie et de partage « APEX », et Camille pour sa bonne humeur et pour nos TP réalisés ensemble. Je remercie aussi les anciens doctorants qui sont

partis vers de nouvelles aventures, que ça a été un plaisir de côtoyer : Julien, Célia, Guillaume, Arthur, Margaux, Chrystelle, Denis et Sylvain (doctorant adopté).

Je remercie toutes les personnes à l'IBCP qui ont participé de près ou d'un peu plus loin à ces 4 années de thèses. Plus particulièrement, je tiens à remercier Guila et Patricia Rousselle de m'avoir donné goût à la science. Je remercie également Sébastien Violot de m'avoir fait découvrir les TPs en présentiel, son dynamisme et sa passion pour l'enseignement. Je remercie également Annick pour nos discussions et ses conseils en tout genre, mais aussi pour ta bonne humeur. Je remercie aussi les personnes qui ont contribué à la vie au laboratoire ; Patricia, Nicolas, Dorothee et Souad.

Bien évidemment, je remercie aussi les personnes qui m'ont soutenues tout au long de cette thèse. Papa, Maman, vous m'avez permis d'en arriver jusque-là et m'avez toujours incité à faire ce qu'il fallait pour atteindre mes objectifs. Aurélien, mon frère, merci d'avoir partagé quelques années sur Lyon avec moi, et d'avoir joué le rôle confident sur la science grâce à tes connaissances à ce sujet. Je te remercie également pour ta bonne humeur, nos nombreuses heures de discussions en tout genre et nos fous rires. Je remercie également ma famille en général, et plus particulièrement ma famille d'adoption, qui a toujours été là pour moi et qui a contribué à un équilibre dans ma vie. Je vous remercie aussi pour votre patience et votre compréhension vis-à-vis de mon travail, qui ne me rendait pas toujours très disponible. Je remercie également mes amis, pour les moments agréables que l'on a passés (et que l'on passera encore !), pour nos ateliers cuisine en tout genre, la découverte de nouvelles activités (les jeux !), nos fous rires et nos tours en moto. Je remercie aussi ma Plume, pour sa présence, sa bonne humeur et les bouffées d'air frais au quotidien.

Tony, quelques mots pour te remercier, qui ne seront cependant jamais assez forts. Je te remercie pour ton soutien sans faille depuis tout ce temps ; je n'ai pas choisi la voie la plus courte ! Merci aussi pour ta patience pour mon travail qui ne me rendait pas toujours disponible, d'avoir écouté mes explications scientifiques, et pour mes répétitions auxquelles tu as assisté sans en connaître le sujet. Tu auras tout de même retenu certaines notions, et découverts de nouveaux mots que j'applique au quotient (lapsus professionnel) ! Merci d'avoir partagé mes joies, mes peines, pour nos moments de rire et de complicité, mais aussi pour ton goût des choses faites soi-même, tellement meilleures. Ta passion pour la cuisine et le travail du bois aurons permis de remplir le frigo et de réaménager la maison ! Merci de partager ma vie, vers l'infini et l'au-delà.





# Sommaire



## Table des matières

<b>Abréviations</b> .....	<b>19</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>23</b>
<b>Exposé bibliographique</b> .....	<b>31</b>
<b>I. La phosphorylation des protéines bactériennes</b> .....	<b>33</b>
1. Le système phosphoenolpyruvate/sucre phosphotransferase PTS .....	35
2. Le système à deux composants TCS .....	36
3. Les Sérine/Thréonine protéine-kinases de type Hanks STPK .....	37
3.1. Caractéristiques structurales et fonctionnelles .....	38
3.1.1. Le domaine cytoplasmique .....	39
3.1.2. Le domaine extracellulaire .....	41
3.2. Les phosphatases des STPK .....	42
3.3. Les rôles physiologiques des STPK .....	43
4. Les Tyrosines protéine-kinases bactériennes BYK .....	44
4.1. Organisation structurale .....	44
4.1.1. Le domaine activateur .....	45
4.1.2. Le domaine catalytique .....	46
4.1.3. Structure des BYK .....	47
4.2. Les phosphatases des BYK .....	48
4.3. Les rôles physiologiques des BYK .....	49
5. Les protéine-kinases atypiques .....	50
5.1. Des protéine-kinases singulières .....	50
5.2. Les Arginines protéine-kinases .....	51
5.3. Les protéine-kinases bactériennes ubiquitaires UbK .....	52
<b>II. La bactérie <i>Streptococcus pneumoniae</i></b> .....	<b>53</b>
1. Caractéristiques biologiques du pneumocoque .....	53
1.1. Description générale de <i>S. pneumoniae</i> .....	53
1.2. Les facteurs de virulence .....	57
1.2.1. La capsule .....	57
1.2.2. LytA .....	60
1.2.3. La pneumolysine .....	60
1.3. La transformation naturelle chez <i>S. pneumoniae</i> .....	62
1.3.1. La compétence .....	62
1.3.2. Le transformasome .....	65
2. Morphogénèse et division cellulaire de <i>S. pneumoniae</i> .....	66
2.1. Synthèse de la paroi .....	67
2.1.1. Composition de la paroi .....	67
2.1.2. Synthèse du peptidoglycane .....	70
2.1.3. Les PBPs .....	71



2.1.4.	Les régulateurs des PBPs .....	73
2.1.5.	Remodelage de la paroi .....	76
2.2.	Composition et assemblage de la machinerie de division .....	78
2.2.1.	Mise en place du site de division .....	78
2.2.1.1.	SsgAB .....	79
2.2.1.2.	PomXYZ .....	80
2.2.1.3.	MapZ .....	80
2.2.2.	Le divisome .....	82
2.2.2.1.	FtsZ .....	82
2.2.2.2.	Les protéines régulatrices de l'anneau Z .....	83
2.2.3.	Assemblage de la paroi au cours de la division cellulaire .....	86
2.2.3.1.	Modèle de synthèse à deux machineries .....	87
2.2.3.2.	Modèle de synthèse à une machinerie .....	90
2.2.3.3.	Modèle de synthèse/remodelage de la paroi .....	92
III.	La régulation du cycle cellulaire de <i>S. pneumoniae</i> par la phosphorylation .....	94
1.	StkP .....	94
1.1.	Caractéristiques structurales de StkP .....	94
1.2.	Les rôles de StkP dans la division cellulaire .....	96
1.3.	La phosphatase PhpP .....	102
2.	CpsD .....	102
2.1.	Organisation structurale de CpsD .....	102
2.2.	Rôles biologiques de CpsD .....	103
2.2.1.	Biosynthèse de la capsule .....	103
2.2.2.	Coordination de la synthèse de la capsule et la ségrégation du chromosome .....	106
	<b>Objectif des travaux.....</b>	<b>109</b>
	<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>111</b>
I.	Souches et conditions de culture .....	113
1.	Souches et conditions de culture de <i>S. pneumoniae</i> .....	113
2.	Courbes de croissance de <i>S. pneumoniae</i> .....	118
3.	Transformation de <i>S. pneumoniae</i> .....	118
4.	Souches et conditions de culture d' <i>E. coli</i> .....	119
5.	Transformation d' <i>E. coli</i> .....	120
II.	Techniques de biologie moléculaire .....	120
1.	Amplification d'ADN par PCR .....	120
2.	Construction de fragments d'ADN par PCR d'hybridation .....	124
3.	Electrophorèse des fragments d'ADN sur gel d'agarose .....	125

4.	Purification d'ADN .....	126
5.	Digestion par des enzymes de restriction .....	126
6.	Ligation .....	126
7.	Extraction d'ADN plasmidique .....	127
III.	<b>Techniques de biochimie .....</b>	<b>128</b>
1.	Préparation d'extraits protéiques totaux de <i>S. pneumoniae</i> .....	128
2.	Dosage protéique par la méthode de Bradford .....	128
3.	Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes SDS-PAGE .....	129
4.	Coloration des gels SDS-PAGE au Bleu de Coomassie .....	129
5.	Coloration des gels SDS-PAGE au nitrate d'argent .....	130
6.	Transfert des protéines sur membrane de PVDF et immunorévélation .....	130
7.	Purification des protéines possédant une étiquette 6-His .....	131
8.	Tests de phosphorylation <i>in vitro</i> .....	132
9.	Tests de phosphorylation <i>in vitro</i> avec de l'ATP radioactif .....	132
10.	Co-immunoprécipitation .....	133
11.	Préparation de peptidoglycane de <i>S. pneumoniae</i> .....	134
IV.	<b>Techniques de microscopie .....</b>	<b>135</b>
1.	Microscopie optique à contraste de phase et à fluorescence .....	135
2.	Marquage des sites d'insertion du peptidoglycane au TDL .....	135
3.	Microscopie électronique à balayage SEM .....	136
4.	Microscopie électronique à transmission .....	136
V.	<b>Techniques de biophysique .....</b>	<b>137</b>
1.	Diffusion dynamique de la lumière DLS .....	137
2.	Thermophorèse à micro-échelle MST .....	138
3.	Analyse des protéines purifiées par spectrométrie de masse en tandem couplée à une chromatographie liquide .....	139
VI.	<b>Analyses bio-informatiques .....</b>	<b>139</b>
1.	Alignement de séquences .....	139
2.	Prédiction de structures secondaires .....	140
3.	Modélisation de la structure d'AsnS de <i>S. pneumoniae</i> par homologie .....	140
	<b>Résultats.....</b>	<b>141</b>
I.	<b>L'autotyrosine-kinase UbK est nécessaire à la croissance et à la morphologie cellulaire de <i>S. pneumoniae</i> (article) .....</b>	<b>143</b>

II.	Caractérisation du lien fonctionnel entre AsnS et UbK .....	171
1.	AsnS, une protéine-substrat ou partenaire d'UbK ? .....	171
2.	AsnS, un substrat ancestral d'UbK ? .....	174
III.	Recherche de partenaires/substrats d'UbK .....	177
1.	L'environnement génétique d' <i>ubk</i> .....	178
1.1.	Les gènes de l'opéron <i>ubk</i> .....	178
1.2.	Rôle d'UbK dans la compétence .....	182
1.2.1.	Expression d' <i>ubk</i> lors de la compétence .....	182
1.2.2.	Fonctionnalité de la compétence en absence d' <i>ubk</i> .....	184
1.2.3.	Rôle d'UbK dans la transformation bactérienne .....	193
1.2.4.	Compétence et phosphorylation d'UbK .....	197
1.2.5.	Recherche de partenaires et/ou de substrat d'UbK en lien avec le développement de la compétence .....	199
2.	Etude du lien entre UbK et le cycle cellulaire .....	201
2.1.	Intégrité de la paroi en absence d' <i>ubk</i> .....	202
2.2.	UbK et la machinerie de division .....	204
2.3.	Rôle d'UbK dans la réplication/ségrégation des chromosomes .....	212
	<b>Discussion</b> .....	<b>215</b>
	<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>233</b>

## Abréviations

aDA-DA : D-Ala-D-Ala fluorescent modifié

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNp : ADN plasmidique

*A. johnsonii* : *Acinetobacter johnsonii*

ARN : Acide RiboNucléique

ARNt : Acide RiboNucléique de transfert

ATP : Adénosine TriPhosphate

*B. subtilis* : *Bacillus subtilis*

BLAST : Outil de recherche d'alignement local de base (Basic Local Alignment Search Tool)

BYK : Tyrosine-kinases bactériennes (Bacterial Tyrosine – Kinases)

*C. crescentus* : *Caulobacter crescentus*

*C. glutamicum* : *Corynebacterium glutamicum*

CBD : Domaine liant la choline (Choline Binding Domain)

CDCs : Cytolysine dépendante du cholestérol (Cholesterol-Dependant Cytolysines)

CPS : Capsule Polysaccharidique

CSP : Peptide stimulant la compétence (Competence Stimulating Peptide)

Da : Dalton

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DLS : diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering)

dNTPs : désoxyriboNucléotides TriPhosphates

DO : Densité Optique

dSTORM : Microscopie de reconstruction optique stochastique directe (direct STochastic Optical Reconstruction Microscopy)

*E. coli* : *Escherichia coli*

FDAAs : Acides-aminés de type D fluorescents (Fluorescent D-Amino-Acids)

*H. influenzae* : *Haemophilus influenzae*

*G. stearothermophilus* : *Geobacillus stearothermophilus*

GTP : Guanosine TriPhosphate

GFP : Protéine Fluorescente Verte (Green Fluorescent Protein)

HPLC : Chromatographie liquide à haute pression (High Pressure Liquid Chromatography)

HRP : Peroxydase de Raifort (*HorseRadish Peroxidase*)

LB : Milieu Luria-Bertani

LC-MS<sup>2</sup> : Spectrométrie de masse en tandem couplée à une chromatographie liquide (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*)

LMW-PTP : Protéines-Tyrosine-Phosphatases de faible poids moléculaire (*Low-Molecular-Weight Protein-Tyrosine-Phosphatases*)

LUCA : Dernier Ancêtre Commun Universel (*Last Universal Common Ancestor*).

*M. tuberculosis* : *Mycobacterium tuberculosis*

*M. xanthus* : *Myxococcus xanthus*

MET : Microscopie Electronique à Transmission

MS : Spectrométrie de masse (*Mass Spectrometry*)

MST : Thermophorèse à micro-échelle (*MicroScale Thermophoresis*)

*N. meningitidis* : *Neisseria meningitidis*

NAG : N-acétylglucosamine

NAM : acide N-acétylmuramique

NO : Nucleoid Occlusion

OMS : Organisation Mondiale de la Santé (*WHO : World Health Organization*)

*ori* : Origine de réplication

*P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*

*P. horikoshii* : *Pyrococcus horikoshii*

PASTA : Protéine de liaison à la pénicilline et domaine associé à la Sérine/Thréonine kinase (*Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase-Associated domain*)

PBP : Protéine liant la Pénicilline (*Penicillin Binding Protein*)

PCR : Réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction*)

PCV : Vaccin conjugué pneumococcal (*Pneumococcal Conjugate Vaccine*)

PEP score : Score de probabilité d'erreur postérieure (*Posterior Error Probability*)

PEP : Phosphoénolpyruvate

PHP : Phosphoestérases Histidinol Phosphate

PPM : Protéine phosphatase dépendante des métaux (*Protein Phosphatase Metal dependant*)

PPP : Phosphatase phosphoprotéine (*PhosphoProtein Phosphatase*)

PSM : Correspondance de spectres de peptide (*Peptide Spectra Matches*)

PTM : Modifications post-traductionnelles (*Post-Translational Modifications*)

PTP : Protéine-Tyrosine Phosphatase (*Protein Tyrosine Phosphatase*)

PTS : Système phosphotransférase (*PhosphoTransferase System*)

PVDF : PolyVinidylidène Fluorure

qRT-PCR : Transcription inverse quantitative par PCR (*quantitative Reverse Transcription – PCR*)

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

*S. coelicolor* : *Streptomyces coelicolor*

*S. pneumoniae* : *Streptococcus pneumoniae*

SEDS : Protéines impliquées dans la forme, l'élongation, la division et la sporulation (*Shape, Elongation, Division and Sporulation*)

SEM : Microscopie électronique à balayage (*Scanning Electron Microscopy*) :

STPK : Sérine/Thréonine Protéine-kinases

t<sup>6</sup>A : N<sup>6</sup>-Threonylcarbamoyl Adenosine

TCS : Système à deux composants (*Two Component System*)

TDL : TAMRA-D-Lysine

*ter* : site de terminaison de la réplication

TG : Activité transglycosylase

THY : Milieu Todd Hewitt Yeast Extract

TP : Activité transpeptidase

UbK : Kinase bactérienne ubiquitaire (*Ubiquitous Bacterial Kinase*)

UVs : ultraviolets

WT : Souche sauvage (*Wild Type*)



# Introduction

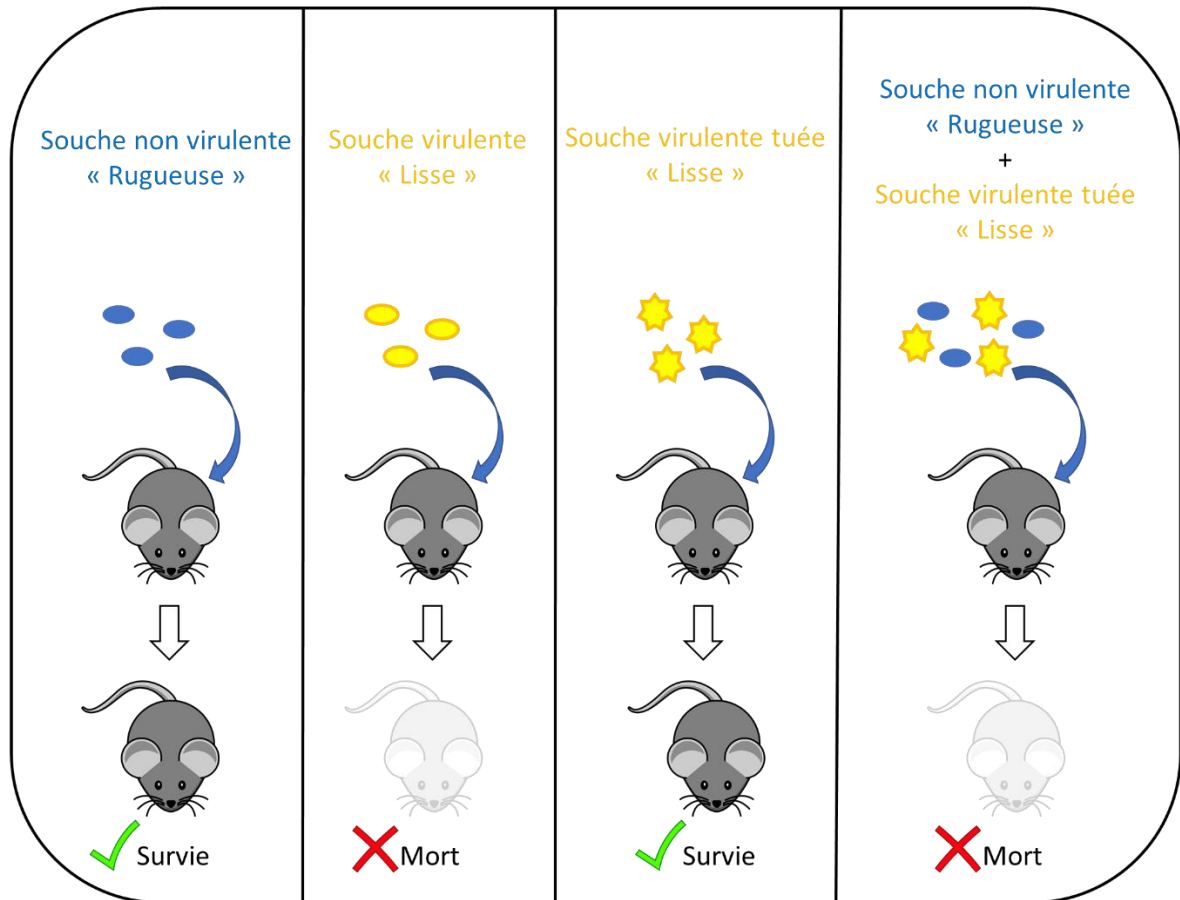
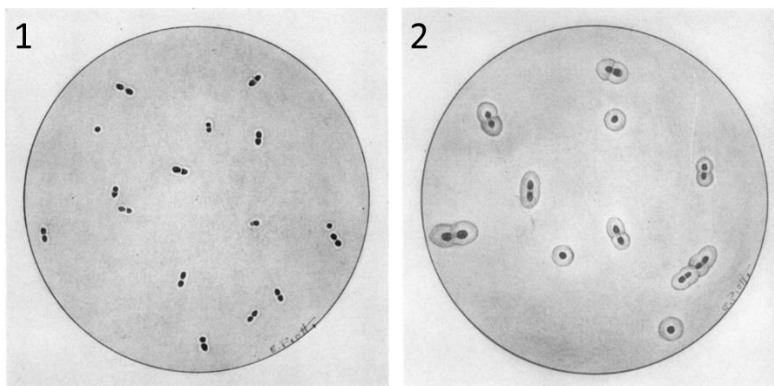




Le pneumocoque a été identifié en 1881 simultanément par George Miller Sternberg aux Etats-Unis et Louis Pasteur en France. Ce dernier fit état d'une « nouvelle maladie » développée par le lapin après injection sous-cutanée de la salive d'un enfant malade. Il décrit également la capsule, le facteur de virulence principal de la bactérie (Pasteur, 1881). Par des expériences similaires, G. M. Sternberg, dans le cadre de ses études sur la malaria, a lui aussi observé les propriétés virulentes de sa propre salive injectée à un lapin. Le scientifique a décrit la présence dans le sang du lapin d'un « nombre immense de microcoques, le plus souvent joints par paires et qui ont un diamètre de 0.5  $\mu\text{m}$  » (Sternberg, 1881). L'observation de cette caractéristique valut à la bactérie le nom de *Diplococcus pneumoniae*. Elle fut ensuite renommée *Streptococcus pneumoniae*, de par sa capacité à former des chaînes non linéaires dans les milieux liquides (Kauffmann et al., 1960; Watson et al., 1993).

En 1875, Edwin Klebs fut le premier à observer des bactéries dans les voies respiratoires des personnes décédées de pneumonie (Moreillon et al., 2000). Malgré plusieurs tentatives d'identification des bactéries responsables de la maladie, il fallut attendre la coloration de Gram en 1884 pour observer un « capsulocoque » Gram positif, c'est-à-dire un *cocci* composé d'une « paroi » épaisse, dans les poumons de patients décédés de pneumonie (Austrian, 1981; Moyes et al., 2009). Le rôle du pneumocoque dans la pneumonie fut ainsi établi.

L'expérience de Frederick Griffith, en 1928, permit de mettre en évidence le caractère virulent de la capsule du pneumocoque (Griffith, 1928). Il injecta à des souris des pneumocoques non capsulés d'aspect « rugueux », ou capsulés dit « lisses » (Figure 1A). La présence de la capsule conduisit à la mort des souris, démontrant l'effet de la capsule dans l'infection. De plus, l'injection conjointe de pneumocoques non capsulés « rugueux » et d'une petite quantité de pneumocoques tués et capsulés « lisses » à une souris, résulte en la mort de l'animal (Figure 1A). De manière intéressante, l'analyse de son sang détermina la présence de pneumocoques capsulés, traduisant un transfert de la caractéristique « lisse » à la bactérie « rugueuse » (Griffith, 1928). F. Griffith décrit ceci comme un « principe transformant », qui fut identifié plus tard par Oswald Avery en 1943 comme étant de l'ADN, le support de l'information génétique (Avery et al., 1943). C'est dans les années 1930 que la réaction de Neufeld, par laquelle un sérum spécifique permet le gonflement de la capsule visible à l'œil nu, est devenue une référence pour le typage des sérotypes des pneumocoques chez l'homme (Figure 1B) (Habib et al., 2014).

**A****B**

**Figure 1 : Caractérisation des propriétés antigéniques de la capsule.** A. Expérience de Griffith mettant en évidence les propriétés antigéniques de la capsule. L'injection d'une souche non virulente « rugueuse » (en bleu) permet à la souris de survivre (panel 1) au contraire de l'injection d'une souche virulente « lisse » (en jaune) (panel 2). L'inactivation de la souche virulente par la chaleur permet la survie de la souris (panel 3). L'injection de la souche non virulente et de la souche capsulée tuée par la chaleur, conduit à la mort de la souris (panel 4). Adapté de (Griffith, 1928). B. Typage des sérotypes par la réaction de Neufeld. 1. Réaction négative à un sérum. 2. Réaction positive à un sérum. Extrait de (Kislak et al., 1965).

Un traitement vaccinal a été mis en œuvre et dirigé contre plusieurs sérotypes de la capsule en 1945 (Macleod et al., 1945). Néanmoins, l'utilisation des vaccins fut délaissée après le succès des antibiotiques à cette époque (Mäkelä & Butler, 2014).

C'est après la découverte de la pénicilline en 1928 par Alexander Flemming, que débuta la recherche de molécules anti-microbiennes naturelles. Dans les années 1940-1970, on découvrit la plupart des antibiotiques que l'on utilise encore actuellement (Jacobs et al., 1978). Cependant, l'utilisation massive de drogues anti-microbiennes a généré des résistances. Le pneumocoque a fait partie des premières bactéries identifiées comme étant capable de résister aux antibiotiques, et plus particulièrement à l'optochine, utilisée comme marqueur en diagnostic chez l'homme (Moore & Chesney, 1917). C'est en 1965 que fut découvert le premier isolat clinique avec une susceptibilité à la pénicilline réduite (Kislak et al., 1965). Dès lors, de plus en plus de souches ont montré des résistances à d'autres antibiotiques, et c'est en 1977 que des souches multi-résistantes ont fait leur apparition, dans un premier temps chez des enfants (Jacobs et al., 1978).

Les vaccins ont alors retrouvé leur place en tant que stratégie préventive pour lutter contre le pneumocoque. L'essor de nouvelles techniques analytiques et des études génétiques, avec notamment l'identification de l'opéron codant les gènes de synthèse de la capsule polysaccharidique du pneumocoque, ont permis de mieux appréhender la structure chimique de la capsule et donc la diversité des sérotypes capsulaires existants (Geno et al., 2015). De nouveaux vaccins ont ainsi été élaborés, basés sur les polysaccharides de la capsule, dont le premier en 1977 couvrait 14 sérotypes identifiés, et 23 en 1983 (Pilishvili et al., 2010). Bien que ce dernier couvre 90% des infections liées au pneumocoque, la réponse au traitement est dépendante à la fois de la dose et de l'âge : le vaccin est ainsi peu immunogénique chez les enfants de moins de 2 ans (Robbins et al., 1983; WHO, 2015). Ceci a conduit au développement de vaccins conjugués à des protéines transporteuses (Poolman et al., 2013). Notamment, le premier PCV (*Pneumococcal Conjugate Vaccine*) a été breveté aux Etats-Unis en 2000 et incluait les sérotypes des isolats retrouvés chez la plupart des enfants de moins de 5 ans. Le dernier vaccin conjugué en date est le PCV13 couvre 65 à 80% des sérotypes. Cependant, le nombre de sérotypes du pneumocoque identifiés a continué d'augmenter pour atteindre 97 identifiés en 2015 (Geno et al., 2015).

L'usage des vaccins et des antibiotiques a donc stimulé la capacité de la bactérie à s'adapter et échapper à cette pression sélective. Ainsi, le pneumocoque est responsable de la

mort de plus d'un million et demi de personnes par an et a été classé par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) dans la liste des pathogènes prioritaire pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques (Tacconelli et al., 2017). Face à ce nouveau défi, il est nécessaire de trouver des nouvelles cibles thérapeutiques, ce qui passe par la compréhension des mécanismes moléculaires qui gouvernent sa physiologie.

Pour survivre dans l'hôte, la bactérie doit être en mesure de se diviser tout en conservant son caractère pathogène. La division cellulaire est un processus essentiel et finement régulé. Des études ont notamment montré que les bactéries mettent en place des mécanismes de régulation par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation (Kobir et al., 2011). Cette dernière est un moyen rapide et réversible pour modifier les propriétés physico-chimiques d'une protéine. La phosphorylation est réalisée par des protéine-kinases qui catalysent le transfert d'un phosphate sur un acide-aminé spécifique d'une protéine-substrat pour moduler ses propriétés physiologiques. Historiquement, la phosphorylation sur la Sérine, la Thréonine et/ou la Tyrosine était exclusivement réservée aux Eucaryotes (Pawson & Scott, 2005). Presque 50 ans après la découverte de ces protéine-kinases chez les Eucaryotes, des protéines de ce type ont également été caractérisées chez des Bactéries : Pkn1, une Sérine/Thréonine protéine-kinase chez *Myxococcus xanthus* et Ptk, une Tyrosine protéine-kinase chez *Acinetobacter johnsonii* (Grangeasse et al., 1997; Muaoz-Dorado et al., 1991). Les protéine-kinases Eucaryotes se sont avérées être des cibles thérapeutiques de choix, puisqu'elles sont impliquées dans des voies de signalisation majeures, voies parfois détournées pour la prolifération des cellules cancéreuses. Par exemple, l'Imatinib est un inhibiteur compétitif de la Tyrosine protéine-kinase Bcr-Abl responsable de la surproduction de leucocytes dans le cadre de la leucémie myéloïde chronique (Claudiani & Apperley, 2018). Ainsi, cibler les protéine-kinases impliquées dans des processus essentiels à la survie des bactéries pourrait constituer une bonne stratégie thérapeutique.

Le pneumocoque est un modèle d'étude simple de la phosphorylation car il ne possède qu'un exemplaire de protéine-kinase de chacune des deux familles connues chez les bactéries : une Sérine/Thréonine protéine-kinase StkP et une Tyrosine protéine-kinase CpsD. StkP a été démontrée comme impliquée dans la division cellulaire (Beilharz et al., 2012; Fleurie et al., 2012; Zucchini et al., 2017). L'autophosphorylation de CpsD joue un rôle clé dans la synthèse de la capsule, le facteur principal de la virulence de la bactérie, mais coordonne également la

division cellulaire *via* la protéine RocS (Nourikyan et al., 2015 ; Mercy et al., 2019). La publication du premier phosphoprotéome du pneumocoque sur les Sérines, Thréonines et Tyrosines a révélé une centaine de protéines-substrats (Sun et al., 2010). En l'état des connaissances, il est difficile de penser que seules les deux protéine-kinases connues du pneumocoque sont responsables de l'ensemble de ces phosphorylations, laissant à penser que d'autres protéine-kinases existent chez le pneumocoque.

Mon travail de thèse a commencé suite à l'identification d'une nouvelle famille de protéine-kinase, possédant des domaines signature particuliers, nommée UbK « *Ubiquitous Bacterial Kinase* », qui, comme son nom l'indique, est conservée au sein du règne bactérien. La protéine-kinase de cette famille chez *Bacillus subtilis*, YdiB, a été décrite comme phosphorylant la Sérine, la Thréonine et la Tyrosine, et participerait à la résistance au stress oxydatif ainsi qu'à la synthèse de l'ARNt modifié t<sup>6</sup>A (N6-Threonylcarbamoyl Adénosine) (El-Khoury et al., 2020; Nguyen et al., 2017). Au laboratoire, nous avons identifié la protéine UbK chez le pneumocoque, et j'ai démontré qu'il s'agit d'une autotyrosine-kinase essentielle et nécessaire pour la croissance cellulaire et la morphogénèse. J'ai étudié au cours de ma thèse les mécanismes moléculaires gouvernant l'activité kinase d'UbK et recherché de potentiels substrats/partenaires de cette protéine. La compréhension du rôle d'UbK du pneumocoque permet de mieux décrire sa physiologie. UbK pourrait, *in fine*, constituer une cible potentielle dans la lutte contre les infections bactériennes, en particulier au pneumocoque.

Avant de décrire les résultats de mes travaux, je présenterai dans la première partie de mon exposé bibliographique l'état du savoir sur la phosphorylation bactérienne en décrivant les différentes familles de protéine-kinases. Dans une seconde partie, je présenterai le cycle cellulaire de *S. pneumoniae*, avec notamment la synthèse de la paroi et les différents acteurs impliqués dans sa mise en place et sa régulation. Enfin, je me concentrerai sur la régulation des différents processus du cycle cellulaire de *S. pneumoniae* par la phosphorylation.



# Exposé bibliographique





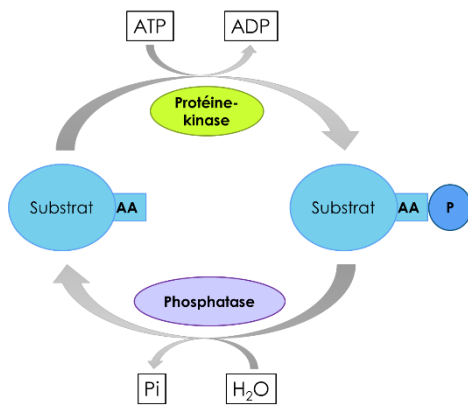
## I. La phosphorylation des protéines bactériennes

Les êtres vivants utilisent un réseau de modifications post-traductionnelles PTM (*Post-Translational Modifications*) pour faire face aux changements de l'environnement et réguler diverses fonctions cellulaires. Ces modifications constituent un moyen rapide et réversible de modifier les propriétés physico-chimiques d'une protéine en influençant son repliement, son activité, sa stabilité, sa localisation ou encore ses interactions (Mijakovic et al., 2016). Les PTM se produisent directement sur des protéines synthétisées ou en cours de synthèse, sur des acides-aminés ciblés par des enzymes spécifiques.

Les PTM se distinguent en fonction de la nature du groupement ajouté ou enlevé (Cain et al., 2013). Les PTM peuvent être multiples et de différente nature sur une même protéine afin de générer des effets additionnels et/ou combinés (van Noort et al., 2012). On retrouve par exemple la glycosylation qui consiste à lier de manière covalente un sucre aux protéines, ou encore l'acétylation, qui correspond à l'ajout d'un groupement acétyl (Macek et al., 2019).

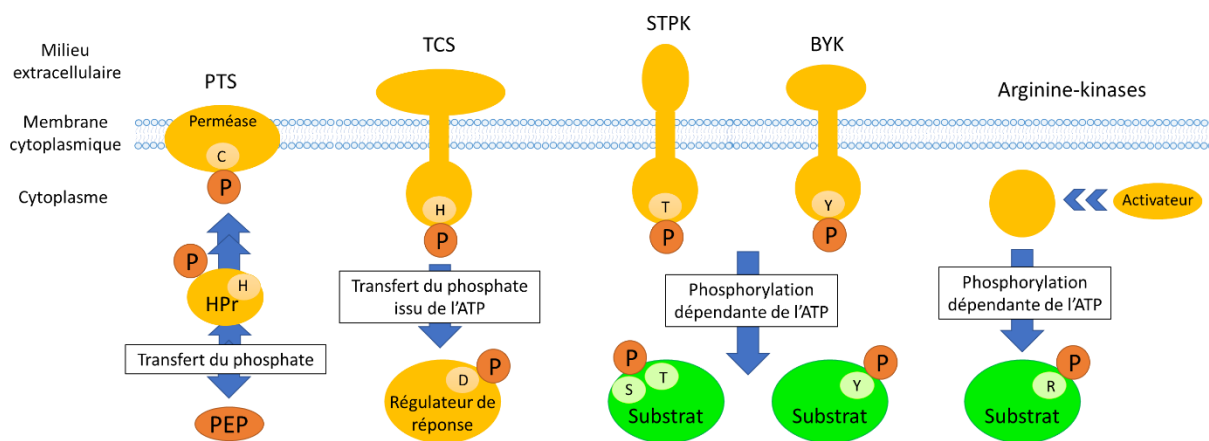
Parmi les PTM, la phosphorylation est une modification ubiquitaire retrouvée dans le règne Animal dont l'Homme, mais également chez les Bactéries et les Archées, bien qu'elle ait été identifiée plus tardivement pour ces deux dernières branches (Cain et al., 2013; Walsh et al., 2005). C'est également une des modifications les plus étudiées et dont les diverses fonctions sont les mieux comprises.

La phosphorylation des protéines a initialement été identifiée chez les Eucaryotes dans les années 1950 (Cohen, 2002; Westheimer, 1987). Elle est assurée par une protéine-kinase, qui catalyse le transfert d'un phosphate, le plus souvent aux dépens de l'ATP, sur un acide-aminé spécifique d'un substrat protéique (Figure 2). Cette modification permet de moduler les propriétés physico-chimiques du substrat afin d'assurer une(des) fonction(s) précise(s). La réaction inverse, dite de déphosphorylation, peut être réalisée par une enzyme spécifique, appelé phosphatase, afin de permettre une régulation très fine de la fonction de la protéine ciblée.



**Figure 2 : Le mécanisme de la phosphorylation.** L'ajout d'un phosphate (ovale bleu foncé « P ») sur un acide aminé AA d'un substrat protéique (ovale bleu clair) est réalisé par une protéine-kinase (ovale vert) au dépens de l'ATP. La déphosphorylation est réalisée par une phosphatase (ovale violet) qui enlève le phosphate du substrat (Pi). Adapté de (Patterson et al., 2014).

Chez les Bactéries, diverses familles de protéine-kinases sont retrouvées en fonction des types d'acides-aminés phosphorylés (Olsen & Mann, 2013). Les grandes familles de protéine-kinase sont : le système phosphoénolpyruvate/sucre phosphotransférase PTS (*PhosphoTransferase System*), le système à deux composants TCS (*Two Component System*), les Sérine/Thréonine protéine-kinases STPK (*Serine/Threonine Protein-Kinases*) et les Tyrosines protéine-kinases typiquement bactériennes BYK (*Bacterial Tyrosine Kinase*) (Figure 3). Ces familles seront présentées dans la partie suivante, en plus d'autres protéine-kinases non conventionnelles telles que les Arginine protéine-kinases (Figure 3).

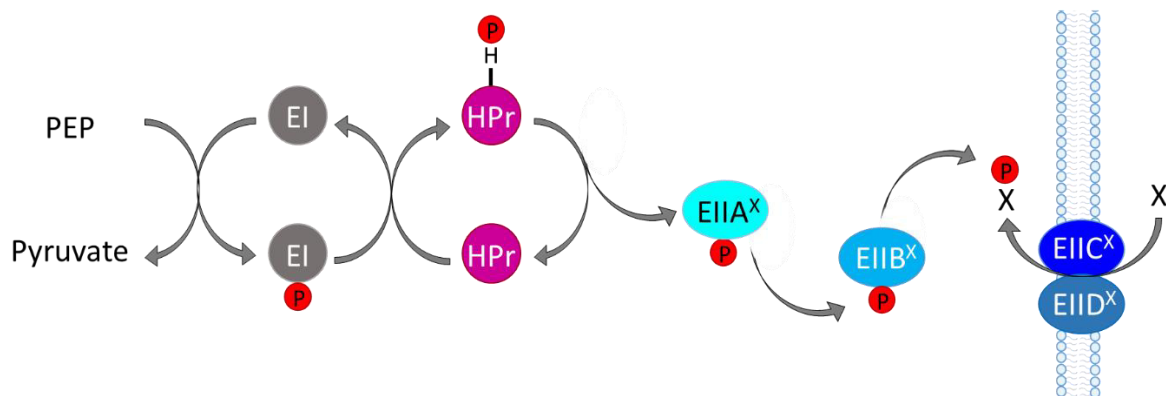


**Figure 3 : Les familles de protéine-kinases bactériennes.** Le PTS implique le transfert du phosphate du Phosphoénolpyruvate PEP vers une perméase *via* la phosphorylation de HPr sur l'Histidine H. Le TCS implique une autophosphorylation sur une Histidine à partir de l'ATP suite à la détection de signaux environnementaux, avant de transférer le phosphate à un régulateur de réponse sur un aspartate D. Les STPK s'autophosphorylent sur une/des Thréonine(s) T et phosphorylent leur(s) substrat(s) sur la Sérine S et/ou la Thréonine. Les BYK s'autophosphorylent sur la Tyrosine Y, et phosphorylent leur substrat sur le même type d'acide-aminé. Ces deux types de famille consomment de l'ATP pour la phosphorylation. Les Arginines kinases sont activées par un(des) activateur(s) et phosphorylent leur protéine cible sur l'Arginine R en consommant de l'ATP. Adapté de (Macek et al., 2019).

## 1. Le système phosphoénolpyruvate/sucre phosphotransférase PTS

Le PTS est impliqué dans le transport et la phosphorylation de sucres chez les Bactéries et les Archées (Postma et al., 1993). Ce système n'est pas décrit chez les Eucaryotes, malgré la présence de protéines lointainement apparentées à certains composants du PTS (Pickl et al., 2012; Tchieu et al., 2001).

Le PTS est constitué de deux composants cytoplasmiques impliqués dans l'absorption de la plupart des substrats du PTS ; l'enzyme EI et la protéine HPr, ainsi que du complexe enzymatique EII spécifique d'un substrat ou d'un groupe de sucres. Le complexe EII est composé des protéines EIIA, EIIB, EIIC, et parfois EIID, qui sont exprimées en présence du substrat dans le milieu. Ces protéines sont successivement phosphorylées sur des Histidines ou des Cystéines, afin de permettre l'import et la séquestration du sucre dans la cellule par phosphorylation (Figure 3 et 4) (Mijakovic & Macek, 2012).



**Figure 4 : Schéma du mécanisme de fonctionnement du PTS pour l'import des sucres.** Le phosphate du PEP (cercle rouge) est transféré sur EI, sur une histidine conservée de HPr, puis successivement sur EIIA, EIIB, EIIC et éventuellement EIID, spécifiques d'un sucre X. Le sucre X est transporté dans la cellule par EIIC (voire EIID) et est phosphorylé par EIIB pour être relargué dans le cytoplasme. Adapté de (Deutscher et al., 2014).

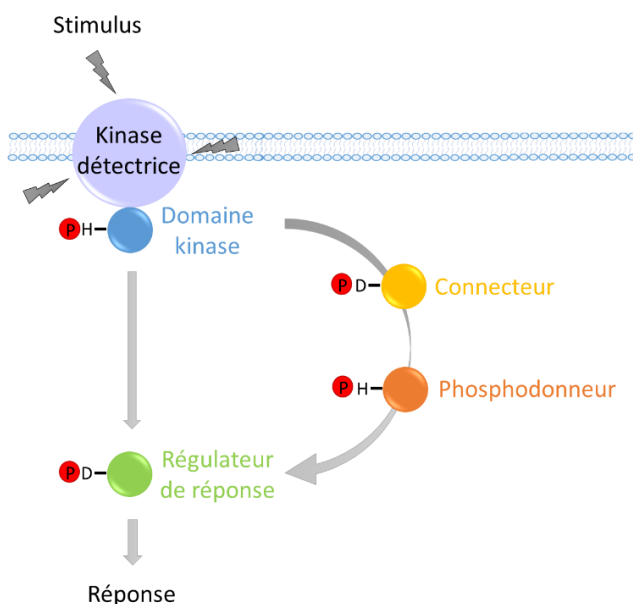
EI est d'abord phosphorylée à partir du donneur de phosphate inusuel PhosphoEnolPyruvate PEP, puis transfère son phosphate à HPr, puis successivement à EIIA et EIIB. La phosphorylation sur EIIB est couramment réalisée sur une Cystéine. Ces transferts de phosphates à haute énergie sont réversibles. Le sucre substrat du PTS lie ensuite la protéine membranaire EIIC du côté extracellulaire, puis est importé dans la cellule pour être

phosphorylé, diminuant son affinité pour EIC et le libérant ainsi dans le cytoplasme (Figure 4) (Galinier & Deutscher, 2017).

## 2. Le système à deux composants TCS

Les bactéries disposent de systèmes de transduction des signaux, appelés TCS, permettant une réponse adaptée aux variations de l'environnement. Ces systèmes sont largement retrouvés chez les Bactéries et les Archées, mais également chez certains Eucaryotes comme les Plantes ou les Champignons, au contraire des Animaux ou des Protistes (Alvarez et al., 2016; Ronson et al., 1987).

Un TCS comprend une Histidine protéine-kinase, capable de « sentir » des signaux environnementaux et, par le biais d'une cascade de phosphorylation, conduire à une réponse adaptée *via* la phosphorylation d'un régulateur de réponse (Figure 3 et 5) (Gómez-Mejia et al., 2017; Stock et al., 2000).



**Figure 5 : Fonctionnement d'un TCS.** Une kinase détectrice (cercle violet) d'un stimulus extracellulaire, membranaire ou cytoplasmique (éclairs gris) s'autophosphoryle sur une Histidine de son domaine kinase (cercle bleu). Le phosphate (cercle rouge « P ») est soit transféré directement sur l'Aspartate du régulateur de réponse associé (cercle vert), soit indirectement sur un Aspartate d'un connecteur (cercle jaune) puis sur une Histidine d'un phosphodonneur (cercle orange). Le régulateur de réponse fournit une réponse adaptée au stimulus. Adapté de (Bretl et al., 2011; Mascher et al., 2006).

La plupart des Histidines protéine-kinases sont membranaires, et peuvent ainsi détecter des signaux extracellulaires ou transmembranaires, par exemple des stress de l'enveloppe ou des variations de températures (Mascher et al., 2006). Le signal détecté induit l'autophosphorylation de la protéine-kinase sur une Histidine, qui peut phosphoryler à son

tour un régulateur de réponse sur l'Aspartate conservé (Figure 5). Ce dernier assure une réponse adaptée, en permettant des interactions entre protéines ou avec l'ADN (Gao et al., 2007).

Certains TCS sont plus complexes, appelés phosphorelais, et impliquent la phosphorylation de protéines intermédiaires avant d'activer le régulateur de réponse (Figure 5) (Bretl et al., 2011).

Afin de revenir à l'état initial, des phosphatases peuvent déphosphoryler l'Histidine protéine-kinase et le régulateur de réponse (Gómez-Mejía et al., 2017; Mascher et al., 2006).

La plupart des TCS sont les produits de gènes organisés en opérons codant pour l'Histidine protéine-kinase et son régulateur de réponse associé. Le pneumocoque possède 13 TCS ainsi qu'un régulateur de réponse dit orphelin, RitR, très conservé (Throup et al., 2000). Par exemple, ces TCS sont impliqués dans la production de bactériocines (système BrpRH), la libération contrôlée de facteurs de virulence (système CbpRS) ou la résistance aux antibiotiques (système WalRK) (Gómez-Mejía et al., 2017). Le développement de la compétence, détaillé dans la partie II, est contrôlé notamment par les TCS ComDE et CiaRH.

### 3. Les Sérine/Thréonine protéine-kinases de type Hanks STPK

Les bactéries sont également capables de produire des Sérine/Thréonine Protéine-kinases (STPK). Elles possèdent des domaines identifiés et définis par S. K. Hanks, retrouvés chez les Eucaryotes mais également chez les Archées (Hanks et al., 1988; Stancik et al., 2018).

La première STPK bactérienne identifiée, possédant des domaines similaires aux STPK eucaryotes, est Pkn1 de *M. xanthus*, qui a permis de définir la famille des STPK dites de type Hanks chez les bactéries (Muaoz-Dorado et al., 1991). Ces protéine-kinases ont été appelées dans un premier temps « *eukaryotic-like STPK* » du fait des similarités avec la superfamille des Sérine/Thréonine/Tyrosine protéine-kinases eucaryotes (Hanks & Hunter, 1995). Il a récemment été proposé que cette similarité est liée à une évolution commune à partir du LUCA (Last Universal Common Ancestor), plutôt qu'à un transfert horizontal de gènes. Ceci a donc conduit

à redéfinir le nom de la famille en protéine-kinases STPK de type Hanks, du fait de la présence des domaines des Hanks (Hanks et al., 1988; Stancik et al., 2018).

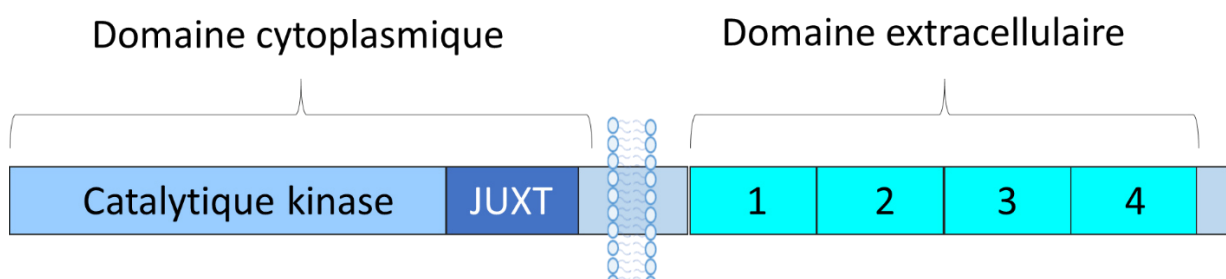
Plusieurs études ont mis en évidence des STPK de type Hanks chez les bactéries, en nombre variable en fonction de l'espèce, et probablement de manière dépendante de la complexité du milieu environnant et donc de la nécessité de s'y adapter (Pereira et al., 2011).

Différents types de substrats protéiques peuvent être phosphorylés par les STPK pour réguler divers processus physiologiques. La stabilité des liaisons phosphoesters mises en jeu nécessite l'action d'enzymes de déphosphorylation, appelées phosphatases, et capables d'hydrolyser le lien phosphoester (Dworkin, 2015; Macek et al., 2019).

Dans cette partie, je présenterai les STPK de type Hanks chez les bactéries, leur caractéristiques structurales et fonctionnelles ainsi que les phosphatases associées. Je décrirai succinctement quelques processus qu'elles régulent tels que la germination de spores, la virulence ou bien la division cellulaire et la synthèse de la paroi.

### 3.1. Caractéristiques structurales et fonctionnelles

Les STPK de type Hanks sont majoritairement membranaires, mais peuvent être également cytoplasmiques comme PknG de *Mycobacterium tuberculosis* (Cowley et al., 2004). Dans cette partie, je décrirai plus particulièrement les STPK membranaires. Elles possèdent un domaine cytoplasmique, un segment transmembranaire et une partie extracellulaire (Figure 3 et 6).



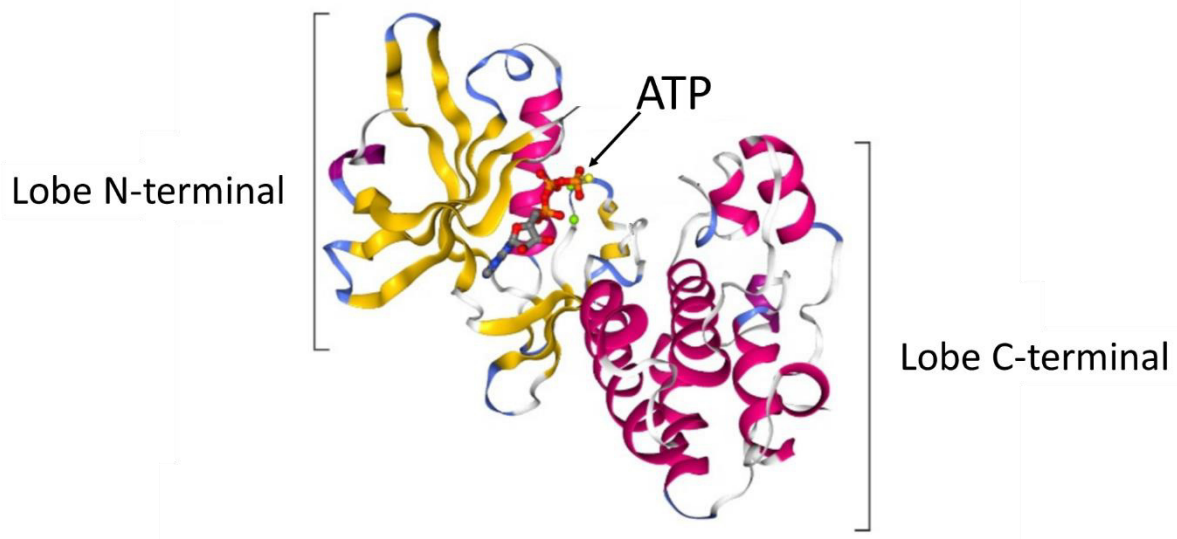
**Figure 6 : Organisation des STPK membranaires.** Le domaine cytoplasmique est composé du domaine catalytique (bleu clair) et d'un domaine juxtamembranaire JUXT (bleu foncé). Le domaine extracellulaire est composé de plusieurs domaines spécifiques (bleu turquoise). Adapté de (Manuse et al., 2015).

### 3.1.1. Le domaine cytoplasmique

Le domaine cytoplasmique est composé d'un domaine catalytique kinase conservé et d'un domaine juxtamembranaire JUXT, proche de la membrane (Figure 6).

Le domaine JUXT est très flexible et sa fonction n'est pas encore très bien connue. Il peut néanmoins être phosphorylé, et contribuer à l'activation de la protéine-kinase et/ou à l'amarrage sa(ses) cible(s) (Manuse et al., 2015). Par exemple, PknB de *M. tuberculosis* est phosphorylée sur deux Thréonines dans son domaine JUXT, ce qui permet la liaison de la protéine FhaA pour participer à la morphogénèse du mycoplasme (Roumestand et al., 2011).

Le domaine catalytique est constitué de douze sous-domaines conservés avec des résidus invariables, définis comme les domaines de Hanks (Hanks et al., 1988; Manuse et al., 2015). Ils se replient en un cœur catalytique formé de deux lobes espacés par une fente où se place l'ATP (Figure 7). Le lobe N-terminal est impliqué dans la liaison et l'orientation de la molécule d'ATP, alors que le lobe C-terminal est responsable de la liaison spécifique au substrat et au transfert du groupement phosphate en position gamma de l'ATP. Dans le lobe C-terminal une boucle d'activation, conservée chez les STPK, détermine la spécificité de substrat et est nécessaire à l'activation de la protéine-kinase (Pereira et al., 2011; Stancik et al., 2018).

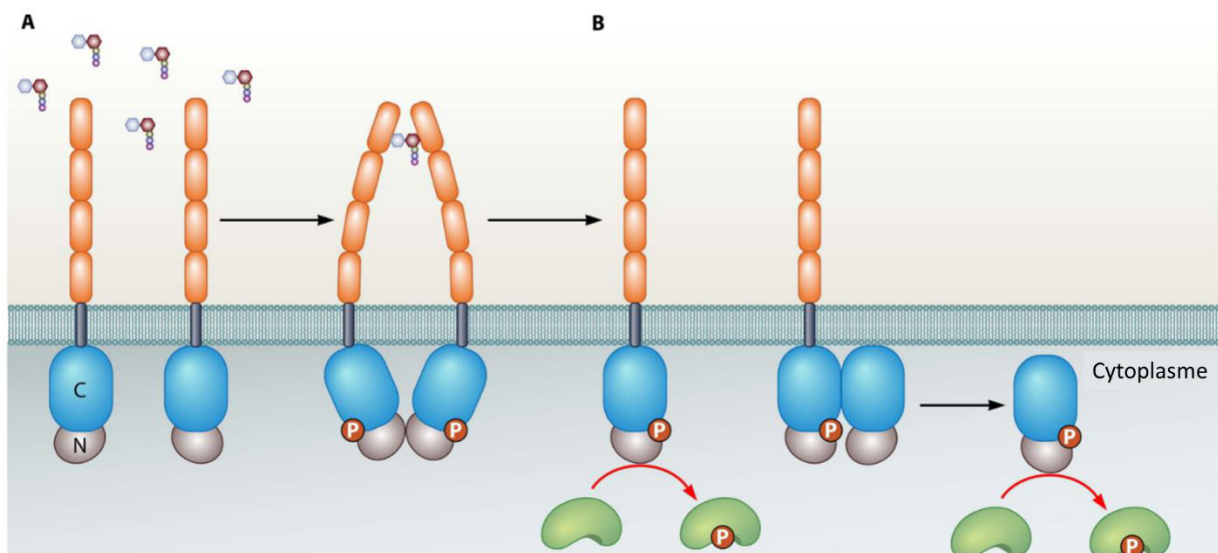


**Figure 7 : Structure du domaine catalytique de PknB de *M. tuberculosis*.** Le domaine catalytique de PknB (Code PDB : 1MRU) est constitué d'un lobe N-terminal constitué principalement de feuillets bêta (en jaune) et d'un lobe C-terminal composé majoritairement d'hélices alpha (en rose). L'ATP (structure en bâton grise et orange) se place entre ces deux lobes en impliquant des ions  $Mg^{2+}$  (ovales verts). Adapté de (Stancik et al., 2018).



Des changements conformationnels ont lieu pour passer d'une forme inactive à active, et ainsi permettre le transfert du phosphate de l'ATP sur les Sérines et Thréonines du(des) substrat(s) (Manuse et al., 2015). Ceci implique à la fois la dimérisation de la protéine-kinase et la phosphorylation de résidus conservés dans la boucle d'activation.

Bien que les mécanismes par lesquels la dimérisation conduit à l'autophosphorylation soient mal connus, la résolution de la structure de PknB en dimères « dos à dos » de monomères liés par une interaction entre les lobes N-terminaux, et « face à face » de monomères liés par une interaction entre les lobes C-terminaux, a permis de conduire à un modèle d'activation (Figure 8).



**Figure 8 : Modèle d'activation de PknB chez *M. tuberculosis*.** A. La fixation d'un ligand au niveau du domaine extracellulaire de la STPK de type Hanks (4 ovales orange) induit le rapprochement des domaines catalytiques intracellulaires des monomères, ce qui résulte en la formation de dimères « dos à dos » liés par les lobes N-terminaux (ovales gris) et l'activation de la kinase par autophosphorylation (cercles rouges « P »). B. La kinase activée peut lier et phosphoryler son substrat (ovale vert), ou activer une kinase transmembranaire ou soluble, par la formation d'un dimère « face à face » *via* les lobes C-terminaux (ovales bleus), laquelle pourra phosphoryler sa cible. Adapté de (Pereira et al., 2011).

Dans ce modèle, la dimérisation dos à dos induirait une activation allostérique de chaque monomère. Puis, la forme activée de ces derniers serait capable de former un dimère face à face au sein duquel les Thréonines de la boucle d'activation de chaque monomère seraient phosphorylées. Enfin, chaque monomère serait capable de phosphoryler ses cibles

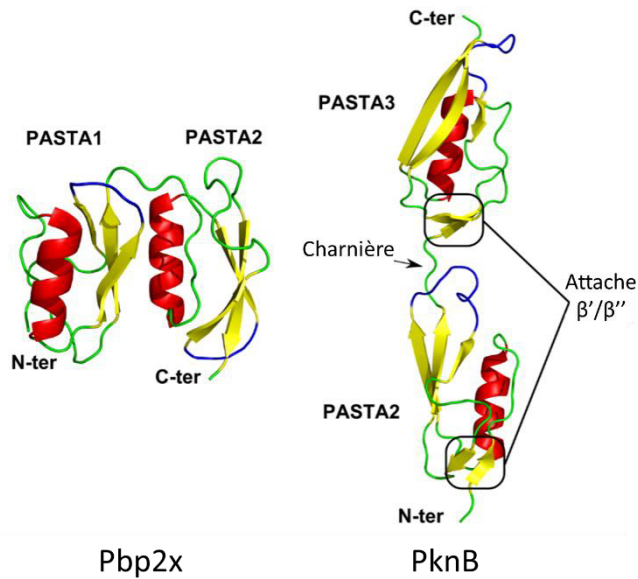
cellulaires jusqu'à ce que le système soit désactivé par déphosphorylation de la boucle d'activation (Figure 8). Cependant, d'autres études ont mis en évidence que des mécanismes alternatifs permettraient l'activation de la protéine-kinase, qui serait provoquée par la phosphorylation en *cis* de la boucle d'activation (Damle & Mohanty, 2014). La dimérisation des STPK ne serait donc pas l'unique processus d'activation et la situation pourrait être plus complexe.

### 3.1.2. Le domaine extracellulaire

Le domaine extracellulaire de STPK est composé de combinaisons de domaines variables. Ils sont impliqués dans la régulation de l'activité des STPK, dans leur localisation subcellulaire ou dans la détermination de la spécificité pour un substrat (Figure 6) (Janczarek et al., 2018).

Le domaine extracellulaire est le plus souvent composé des domaines PASTA (*Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase-Associated domain*). Ils sont connus pour lier des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactames, et sont également présents dans les PBPs (*Penicillin Binding Protein*) qui sont impliquées dans la synthèse de la paroi (Yeats et al., 2002). Les domaines PASTA sont exclusivement présents chez les bactéries, et leur nombre varie selon les espèces. Par exemple, StkP de *S. pneumoniae* possède 4 domaines PASTA, alors qu'il n'en est retrouvé que 3 chez PrkC de *B. subtilis* (Manuse et al., 2015).

Les domaines PASTA présentent une faible homologie de séquence entre eux et des différences d'organisation. Néanmoins, ils montrent une homologie structurale, avec un repliement globulaire de trois brins  $\beta$  et d'une hélice  $\alpha$  (Figure 9). Les domaines PASTA sont disposés linéairement dans les STPK, séparés par de courtes charnières, alors qu'ils sont repliés les uns contre les autres dans les PBPs (Figure 9) (Barthe et al., 2010; Gordon et al., 2000).



**Figure 9 : Organisation structurale des domaines PASTA.** Comparaison de l'organisation des domaines PASTA entre Pbp2x de *S. pneumoniae* (Code PDB : 1QMF) et de PknB de *M. tuberculosis* (Code PDB : 2KUI). Les feuillets bêta sont représentés en jaune et les hélices alpha en rouge. Les domaines PASTA de PknB sont séparés par une charnière, et possèdent en plus de ceux de Pbp2x des feuillets bêta supplémentaires rigidifiant la structure, et des acides-aminés additionnels dans la boucle en bleu impliquée dans la conformation étendue. Adapté de (Manuse et al., 2015).

Les PASTA-STPK jouent un rôle majeur dans la régulation de la division cellulaire et la morphogénèse (Pereira et al., 2011). Il a été proposé que les domaines PASTA possèderaient la particularité d'interagir avec le peptidoglycane de la paroi cellulaire afin de réguler l'activité kinase des STPK. En effet, l'interaction des domaines PASTA avec des fragments de peptidoglycane influence la dimérisation de PkrC de *B. subtilis*, mais également de PknB de *M. tuberculosis* et *S. aureus* (Shah et al., 2008). Il a ainsi été proposé un modèle selon lequel les domaines extracellulaires des PASTA-STPK contribueraient à la localisation cellulaire des STPK au site actif de synthèse du peptidoglycane. L'accumulation de monomères de STPK permettrait d'atteindre un seuil favorisant leur dimérisation, et ainsi l'activation (Figure 8) (Manuse et al., 2015; Mir et al., 2011).

### 3.2. Les phosphatases des STPK

La modification d'une protéine par phosphorylation est réversible. La déphosphorylation est catalysée par des phosphoprotéine-phosphatases. Le nombre de phosphatases codées par les génomes bactériens peut varier énormément et est souvent supérieur au nombre de STPK. Néanmoins, chez certaines bactéries, comme *M. tuberculosis*, une phosphatase seulement est identifiée pour onze STPK (Wehenkel et al., 2007). Il est

intéressant de noter que les gènes de certaines phosphatases sont souvent co-transcrits avec un gène codant pour une STPK. C'est le cas pour PknB/PstP de *M. tuberculosis* ou encore PrkC/PrpC de *B. subtilis* (Boitel et al., 2003; Gaidenko et al., 2002).

Il existe deux superfamilles de phosphatases de STPK : les PhosphoProtéines Phosphatases PPP (*PhosphoProtein Phosphatase*) et les Phosphatases dépendantes des métaux PPM (*Protein Phosphatase Metal dependant*). Les PPP ont une spécificité double car elles sont capables de déphosphoryler les Sérines/Thréonines, mais aussi les Tyrosines. Un exemple au sein de cette famille est TpbA de *Pseudomonas aeruginosa* impliquée dans la formation de biofilms (Ueda & Wood, 2010). Malgré le nombre restreint de phosphatases identifiées jusqu'à présent, la grande majorité appartient à la famille des PPM dépendantes de  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ , qui possèdent un cœur catalytique conservé similaire à celui des phosphatases eucaryotes (Kennelly, 2002). Par exemple, PstP est une PPM qui déphosphoryle la PASTA-STPK PknB chez *M. tuberculosis* pour contrôler la croissance cellulaire (Boitel et al., 2003; Pereira et al., 2011).

### 3.3. Les rôles physiologiques des STPK

Les STPK et leurs phosphatases sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques de par leur capacité à phosphoryler ou interagir avec leurs cibles.

Chez *B. subtilis*, 4 STPK (PrkA, PrkC, PrkD et YabT) sont impliquées dans la formation, la dormance et la germination des spores. PrkC est une PASTA-STPK qui interagit avec le peptidoglycane des cellules en croissance *in vitro*, ce qui induit la germination. Des régulateurs de la synthèse protéique rentrent également en jeu pour contrôler ce processus. Notamment, PrkC phosphoryle les GTPases ribosomales EF-G et CpgA, en réponse à la détection de peptidoglycane, pour participer à la germination quand les conditions deviennent favorables (Pompeo et al., 2012; Shah et al., 2008).

De nombreuses bactéries possèdent des STPK impliquées dans leur virulence. PknB de *Staphylococcus aureus* serait relarguée dans le milieu extérieur et est capable de phosphoryler des cibles de l'hôte afin de perturber la transduction des signaux, ou bien encore la réponse immunitaire de l'hôte (Miller et al., 2010).

Les STPK interviennent dans la division cellulaire et la synthèse de la paroi. PknA et PknB de *M. tuberculosis* fonctionnent de pair en tant que régulateurs de la morphogénèse.

Elles régulent la localisation, la synthèse et la polymérisation de la paroi, en interagissant et en phosphorylant diverses protéines. Par exemple PknA phosphoryle Wag31 (DivIVA) et permet son oligomérisation aux pôles cellulaires, favorisant la synthèse de la paroi à cet endroit. Wag31 phosphorylé, tout comme PknA et PknB, vont agir sur différents acteurs de la synthèse de la paroi, que je ne détaillerai pas ici, pour la réguler (Manuse et al., 2015). Une autre STPK ayant un rôle central dans ces processus est StkP de *S. pneumoniae* qui sera détaillée dans la partie III.

## 4. Les Tyrosines protéine-kinases bactériennes BYK

La première Tyrosine protéine-kinase découverte chez les bactéries est PtkA de *A. johnsonii* (Grangeasse et al., 1998). Depuis, des Tyrosines protéine-kinases bactériennes ont été identifiées chez la plupart des Protéobactéries, Firmicutes et Actinobactéries et sont largement étudiées. La famille la plus répandue de Tyrosine protéine-kinases est celle des BYK, exclusivement bactérienne, que je détaillerai dans cette partie (Grangeasse et al., 2007). Différents types de protéine-kinases phosphorylant la Tyrosine ont néanmoins été détectés. Par exemple, DivL de *Caulobacter crescentus* est homologue aux protéine-kinases retrouvées dans le TCS, mais l'Histidine typiquement conservée et phosphorylée est substituée par une Tyrosine (J. Wu et al., 1999). D'autres protéines, ressemblant aux Tyrosines protéine-kinases des eucaryotes, comme MasK de *M. xanthus* et WaaP de *P. aeruginosa*, pourraient posséder une activité Tyrosine kinase, mais cette activité n'a pas été mise en évidence (Thomasson et al., 2002; Zhao & Lam, 2002).

### 4.1. Organisation structurale

Les BYK sont composées d'un domaine catalytique cytoplasmique et d'un domaine activateur transmembranaire (Figure 3) (Grangeasse et al., 2012). L'organisation générale des BYK diffère entre les Protéobactéries et les Firmicutes. Chez les Protéobactéries, les BYK sont sous la forme d'une protéine membranaire unique (Figure 10). A l'inverse, chez les Firmicutes, les deux domaines sont codés par deux gènes adjacents, et sont donc séparés en deux chaînes

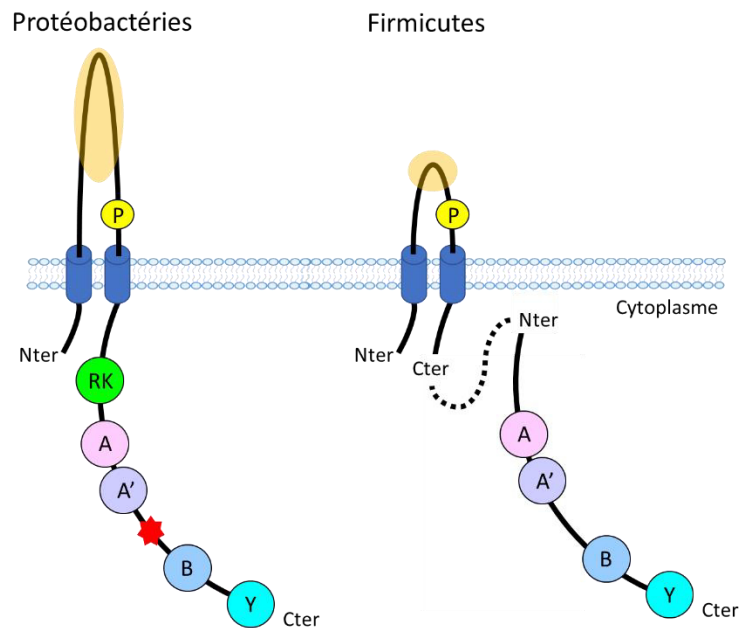
polypeptidiques indépendantes. Elles doivent cependant être réunies pour que la BYK soit fonctionnelle (Figure 10) (Grangeasse et al., 2007). Cette séparation pourrait permettre au domaine catalytique d'interagir avec différents régulateurs. C'est ce qui est proposé par exemple chez *B. subtilis* avec les BYK PtkA et PtkB. Ces protéines peuvent soit « échanger » leurs activateurs TkmA et TkmB, soit interagir avec des régulateurs transcriptionnels, comme SalA qui active *ptkA* (Klotz et al., 2016; Shi et al., 2014).

#### 4.1.1. Le domaine activateur

Le domaine activateur permet d'ancrer la protéine-kinase à la membrane et sert de domaine senseur modulant l'activité des BYK. Il est composé d'une large boucle extracellulaire entre deux segments transmembranaires reliant les extrémités N-terminale et C-terminale cytoplasmiques (Figure 10). C'est la partie C-terminale qui est liée, ou qui interagit, avec le domaine catalytique cytoplasmique chez les Protéobactéries ou les Firmicutes respectivement.

La boucle extracellulaire du domaine activateur serait dédiée à des interactions spécifiques avec des molécules influençant l'activité des BYK. Cette boucle est plus courte chez les Firmicutes, probablement pour s'adapter à des transferts de signaux spécifiques (Grangeasse et al., 2007). Les signaux d'activation des BYK ne sont pas encore bien connus. Une étude mentionne que la présence d'exopolysaccharides EPS est reconnue par la domaine activateur d'EpsA (PtkA), ce qui inhibe l'autophosphorylation d'EpsB (PtkB) pour phosphoryler des substrats de la voie de biosynthèse d'EPS chez *B. subtilis* (Elsholz et al., 2014).

Par ailleurs, des études structurales ont mis en évidence un motif riche en Proline, juste avant la seconde hélice transmembranaire des BYK (Figure 10). Cette région de la BYK Wzc d'*Escherichia coli* est importante pour la polymérisation et la quantité de polysaccharides (Bechet et al., 2009; Obadia et al., 2006).



**Figure 10 : Organisation des BYK chez les Protéobactéries et les Firmicutes.** Les BYK des Protéobactéries ont une unique chaîne protéine membranaire avec des extrémités N-terminale et C-terminale cytoplasmiques et une large boucle extracellulaire composée d'un domaine en épingle à cheveux (ovale orange) et d'un motif riche en proline (ovale jaune « P ») entre deux hélices transmembranaires (cylindres bleus). Le domaine cytoplasmique est composé d'une séquence riche en Arginines et Lysines dit cluster RK (cercle vert « RK »), de domaines Walker A, A' et B (cercles rose, violet et bleu respectivement), d'une séquence riche en Tyrosines phosphorylables (cercle bleu « Y ») et d'une Tyrosine interne pouvant être phosphorylée (étoile rouge). Les BYK des Firmicutes possèdent une chaîne protéique membranaire similaire aux protéobactéries, hormis la longueur de la boucle extracellulaire qui est réduite. Le domaine catalytique cytoplasmique est séparé du domaine activateur membranaire et ne possède pas le cluster RK et la Tyrosine interne. Les sous-unités protéiques doivent interagir (traits pointillés) pour former une BY-kinase fonctionnelle. Adapté de (Bechet et al., 2009; Grangeasse et al., 2007; Mijakovic et al., 2016).

#### 4.1.2. Le domaine catalytique

Le domaine catalytique cytoplasmique est composé des motifs typiques de la famille des BYK (Figure 10). Il porte les motifs de Walker qui sont nécessaires à l'activité autokinase de l'enzyme. Les domaines de Walker A et B sont caractéristiques des protéines liant les nucléotides et correspondent au site de liaison à l'ATP (Grangeasse et al., 2012; Leipe et al., 2003). Le domaine Walker A' n'est généralement pas retrouvé dans les protéines liant les nucléotides. Il est parfois présent dans les protéine-kinases avec un motif Walker B dégénéré, qui phosphorylent des substrats de bas poids moléculaires, ou dans une famille de GTPase particulières de la superfamille de MinD/Mrp (Grangeasse et al., 2007).

A l'extrémité C-terminale du domaine catalytique se trouve un autre motif, riche en Tyrosines, qui constitue le site d'autophosphorylation (Figure 10). Le nombre de Tyrosines présentes est variable et leurs positions non conservées entre les BYK (Grangeasse et al., 2007; Mijakovic et al., 2016).

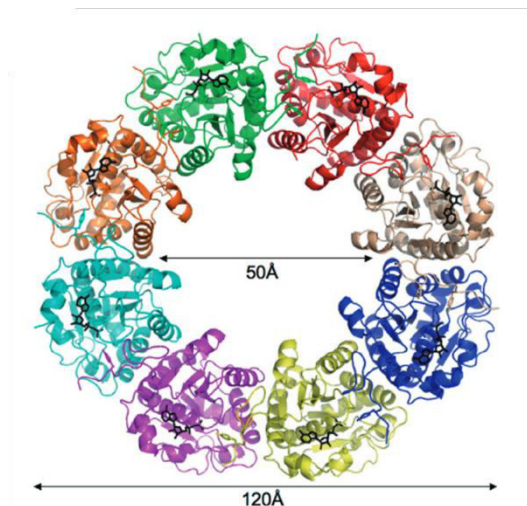
Les BYK des Protéobactéries possèdent également une séquence riche en Arginines et en Lysines nommée « cluster RK » (Figure 10). Ce domaine correspond à la jonction entre le domaine activateur et catalytique, et n'est pas retrouvé chez les Firmicutes. Son rôle n'est pas encore bien connu, mais il serait important pour la fonction de Wzc chez *E. coli*. La partie N-terminale de ce « cluster » est impliquée dans la liaison au nucléotide alors que la partie C-terminale désordonnée serait essentielle à l'activité polymérase de Wzc dans la machinerie de synthèse d'exopolysaccharides (Bechet et al., 2010).

#### 4.1.3. Structure des BYK

La résolution de structures de BYK comme CapB de *S. aureus* et Wzc d'*E. coli* a permis de mieux comprendre le mode de fonctionnement des BYK.

Chez le firmicute *S. aureus*, le domaine catalytique cytoplasmique CapB interagit avec le domaine activateur transmembranaire CapA, ce qui stabilise la liaison au nucléotide par une forte interaction hydrophobe, formant ainsi une BYK fonctionnelle (Olivares-Illana et al., 2008). Il existe deux BYK chez *S. aureus*, CapA1/B1 et CapA2/B2. Une forme chimérique CapA1/B2 a été construite, constituée du domaine catalytique cytoplasmique CapB2 et de la partie cytoplasmique C-terminale du domaine activateur CapA1. Cette association permet à CapB2 d'être plus efficacement activée que par CapA2, et a permis de mettre en évidence le schéma d'activation des BYK. CapB2 non phosphorylé (par mutation de la Lysine catalytique du domaine Walker A) forme une structure octamérique en anneau, dans lequel le dernier résidu du « cluster » de Tyrosine d'un monomère est lié au site actif du monomère suivant (Figure 11). Ainsi, les résidus Tyrosines du cluster sont phosphorylés en *trans* par une autre molécule de BYK, puis l'octamère se dissocie en monomère pour interagir avec ses substrats ou ses régulateurs (Olivares-Illana et al., 2008). Puisque les BYK des Firmicutes sont en deux parties, la protéine cytoplasmique pourrait se détacher de son activateur après phosphorylation.





**Figure 11 : Formation d'un octomère en anneau par les BYK non phosphorylées.** Chaque monomère est représenté par une couleur différente, avec l'ATP lié (structure en bâton noir). Le diamètre interne et externe de la structure est mentionné en Angstrom. Adapté de (Bechet et al., 2010).

Chez la Protéobactérie *E. coli*, la formation d'un anneau octamérique de monomères de Wzc a également été observée (Bechet et al., 2010). Une Tyrosine phosphorylée additionnelle a été identifiée en dehors du cluster de Tyrosine, proche du domaine Walker A' (Figure 10). Elle permettrait la liaison du nucléotide au site actif de l'enzyme et à l'activité kinase (Bechet et al., 2010). Wzc serait donc activée en deux temps, avec une phosphorylation de cette Tyrosine en *cis* dans un premier temps, puis phosphorylation des Tyrosines du cluster en *trans* lors de la formation du complexe oligomérique. Cependant, ce résidu Tyrosine « isolé » particulier ne semble pas phosphorylé chez toutes les BYK des Protéobactéries, suggérant la possibilité d'autres mécanismes d'activation.

Contrairement aux Firmicutes, les BYK des Protéobactéries sont transmembranaires. L'octamère pourrait donc ne pas être dissocié en monomères pour phosphoryler ses substrats comme chez les firmicutes. Les BYK resteraient associées en anneaux oligomériques, avec une conformation ouverte ou fermée selon une alternance de cycles de phosphorylation/déphosphorylation (Collins et al., 2006; Tocilj et al., 2008).

## 4.2. Les Phosphatases des BYK

Les phosphatases des BYK sont classées en deux grandes familles ; les phosphatases conventionnelles PTP (Protein Tyrosine Phosphatase) et les phosphatases de bas poids moléculaire LMW-PTP (Low-Molecular-Weight Protein-Tyrosine-Phosphatases) (Standish & Morona, 2014). Les gènes des phosphatases de la famille des LMW-PTP sont généralement co-transcrits avec celui de la BYK associée chez les Protéobactéries (Grangeasse et al., 1998).

Chez les Firmicutes, les phosphatases associées aux BYK appartiennent à une famille ressemblant aux Phosphoestérases Histidinol Phosphate PHP (Mijakovic et al., 2005, Morona et al., 2002). Un exemple de phosphatase de cette famille est CpsB, qui déphosphoryle la protéine-kinase CpsCD chez *S. pneumoniae* (voir partie III.2.) (Nourikyan et al., 2015). Les phosphatases contrôlent ainsi l'autophosphorylation des BYK et donc leur état d'oligomérisation pour assurer leurs fonctions.

### 4.3. Les rôles physiologiques des BYK

Les BYK sont impliquées dans la régulation de processus cellulaires variés, dont les plus décrits concernent la synthèse et l'export de polysaccharides extracellulaires (capsulaires et exopolysaccharidiques).

Les gènes des BYK sont présents dans des opérons, dont les gènes codent pour une machinerie membranaire dédiée à la synthèse de polysaccharides, leur assemblage dans le cytoplasme, l'export et la polymérisation à l'extérieur de la cellule (voir partie II.1.2.1) (Whitfield, 2006).

Chez *E. coli*, l'autophosphorylation de la BYK Wzc régule positivement la biosynthèse de polysaccharides capsulaires de type I, alors que la phosphorylation d'une seconde BYK, Etk, diminue la production d'un autre exopolysaccharide, l'acide colanique (Grangeasse et al., 2012; Vincent et al., 2000; Wugeditsch et al., 2001). Le rôle régulateur des BYK impliquées dans la synthèse et l'export des polysaccharides extracellulaires n'est cependant pas encore totalement connu. Il a été proposé que les BYK pourraient servir de support et/ou de régulateurs spatiaux pour le recrutement de la machinerie de synthèse de polysaccharides et de ses régulateurs (Grangeasse et al., 2012). Ainsi, les cycles de phosphorylation/déphosphorylation, associés à des conformations monomériques/octamériques, permettraient des interactions sélectives. Un autre modèle propose que la capacité des BYK à former des canaux oligomériques dans les membranes pourrait servir de système de sécrétion des polysaccharides. Notamment, la BYK Wzc interagit avec Wza, un translocon de polysaccharides extracellulaires de la membrane externe, pour traverser les deux bicouches lipidiques présentes chez *E. coli* (Dong et al., 2006; Grangeasse et al., 2012).

Les BYK sont également capables de réguler la biosynthèse des polysaccharides en phosphorylant des substrats. Wzc phosphoryle ainsi la protéine Ugd (UDP-glucose déshydrogénase), qui est responsable de la biosynthèse du précurseur des polysaccharides capsulaire, afin de stimuler la production d'acide colanique (Lacour et al., 2008).

Les BYK phosphorylent différents types de substrats, ce qui leur permet de réguler d'autres processus que la synthèse d'exopolysaccharides. Par exemple, la BYK Etk d'*E. coli* phosphoryle les facteurs sigma et antisigma afin de moduler la réponse au choc thermique (Lacour et al., 2008). PtkA de *B. subtilis* phosphoryle les protéines de liaison à l'ADN SsbA et SsbB afin de stimuler leur capacité à lier l'ADN lors de la réplication, la recombinaison et la réparation (Mijakovic et al., 2006). Si les BYK contrôlent la fonction de certaines protéines par phosphorylation, elles peuvent en réguler d'autres en établissant des interactions. L'exemple de la BYK de *S. pneumoniae* CpsD, qui contrôle la synthèse de la capsule polysaccharidique et la coordonne avec le cycle cellulaire chez les firmicutes, sera présenté dans la partie III (Nourikyan et al., 2015).

## 5. Les protéine-kinases atypiques

### 5.1. Des protéine-kinases singulières

Certaines protéine-kinases bactériennes sont dites atypiques, car elles ne rentrent pas dans les familles de protéine-kinases décrites précédemment, tout en présentant néanmoins certains points communs.

Les enzymes bifonctionnelles HPrK/P (HPr Kinase/Phosphorylase) et IDHK/P (Isocitrate DésHydrogénase Kinase/Phosphorylase) possèdent des domaines de Walker comme les BYK. Elles possèdent non seulement une activité kinase, mais également phosphorylase, dont la liaison phosphoryl est attaquée par un phosphate, et non pas par de l'eau comme avec les phosphatases (Mijakovic et al., 2002, 2016). HprK/P, via son activité kinase ou phosphorylase sur la protéine HPr, stimule ou réprime respectivement l'importation de glucose comme source carbonée en fonction de sa disponibilité dans le milieu (Brückner & Titgemeyer, 2002 ; Galinier & Deutscher, 2017). L'IDHK/P phosphoryle l'IDH (Isocitrate DésHydrogénase) afin

d'inhiber sa fonction dans le cycle de Krebs lorsque le glucose n'est pas disponible. Ceci a pour conséquence l'activation de la voie du glyoxylate qui permet de synthétiser des intermédiaires de ce cycle (Nimmo et al., 1984).

La Sérine/Thréonine protéine-kinase d'*E. coli* YihE possède, quant à elle, des similarités avec les STPK. Elle ne possède pas les motifs signatures de Hanks caractéristiques des STPK, mais sa structure révèle un site actif en deux lobes (Figure 7) (Manuse et al., 2015; Zheng et al., 2007). Cette enzyme pourrait participer à l'expression d'appendices de surface et à la résistance à divers stress environnementaux (Dorsey-Oresto et al., 2013). C'est pour le moment la seule enzyme de ce type décrite dans la littérature.

D'autres types de protéine-kinases existent, qui sont identifiées comme phosphorylant un type d'acide-aminé particulier, sans posséder de motifs signatures des différentes familles de protéine-kinases.

Par exemple, PtkA de *M. tuberculosis* est capable de phosphoryler les Tyrosines, mais ne ressemble pas aux BYK. PtkA est impliquée dans la survie dans le macrophage en conditions d'infection (Wong et al., 2018). Elle phosphoryle la phosphatase PtpA, avec laquelle elle est co-transcrite, ce qui stimule son activité phosphatase et sa sécrétion dans le macrophage pour limiter l'acidification, et donc favoriser la survie de la bactérie.

## 5.2. Les Arginines protéine-kinases

Plusieurs phosphoprotéomes ont mis en évidence que l'Arginine est également un résidu qui peut être phosphorylé chez les bactéries (Figure 3) (Andrews et al., 2008; Bäsell et al., 2014). La résolution de la structure de l'Arginine protéine-kinase McsB de *Geobacillus stearothermophilus* n'a cependant pas permis d'identifier des domaines signatures typiques (Suskiewicz et al., 2019).

Chez *B. subtilis*, McsB est nécessaire au contrôle qualité des protéines synthétisées, plus particulièrement lors de la réponse à un stress thermique et oxydatif (Mijakovic et al., 2016). Sous l'influence d'un stress thermique, McsB est libérée du complexe protéase ClpCP qui prend en charge les protéines agrégées. McsB phosphoryle alors les protéines mal repliées sur des Arginines, ce qui constitue une étiquette stimulant la dégradation par le complexe

protéase ClpCP. Afin de revenir à l'état initial, McsB est déphosphorylée par la phosphatase YwIE de la famille des LMW-PTP (Zhou et al., 2019).

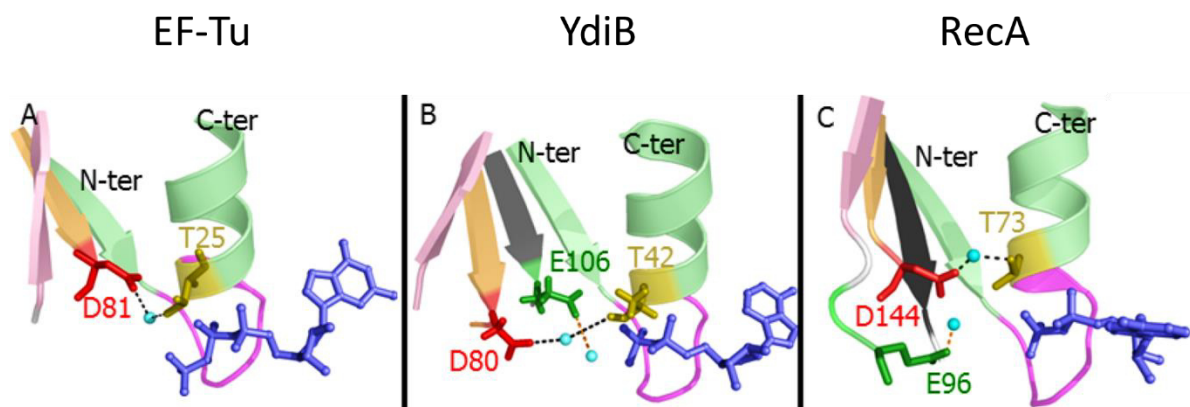
Un système de contrôle qualité des protéines existerait également chez *M. tuberculosis*. En effet, la protéine appartenant au complexe protéase ClpC1 est capable d'interagir avec les Arginines phosphorylées. Cependant l'enzyme permettant cette phosphorylation n'a pas été identifiée (Weinhä et al., 2018).

### 5.3. Les protéine-kinases bactériennes ubiquitaires UbK

Une caractéristique commune à toutes les protéine-kinases est leur capacité d'hydrolyse de la liaison phosphoester d'un nucléotide triphosphate, afin de transférer le phosphate soit pour s'autophosphoryler, soit pour phosphoryler des substrats protéiques. La majorité des protéine-kinases hydrolysent l'ATP et appartiennent de fait à la large famille des protéines dites ATPases à « P-loop », c'est-à-dire capable de former une boucle autour du phosphate gamma du nucléotide. Certaines protéine-kinases hydrolysent préférentiellement le GTP. Chez les protéines à P-loop contenant des motifs de Walker A, il a été identifié à ce jour deux types de repliements, caractérisés par la GTPase EF-Tu et l'ATPase RecA (Figure 12A et C). L'identification récente d'une activité kinase chez l'ATPase YdiB de *B. subtilis* a permis de mettre en évidence un nouveau genre de protéine-kinase (Karst et al., 2009; Nguyen et al., 2017). Le repliement de YdiB, qui possède un motif de Walker A, est unique car il correspond à un mélange des structures connues des protéines à P-loop au niveau de l'ordre et de l'arrangement spatial des feuilletts bêta (Figure 12B). Les quatre feuilletts bêta sont organisés spatialement de la même manière qu'au sein de la protéine RecA, mais le dernier brin est orienté de manière anti-parallèle comme dans la protéine EF-Tu (en rose Figure 12B).

YdiB n'a pas d'activité GTPase, mais présente une activité ATPase, qui a été reportée comme étant faible (Karst et al., 2009). YdiB est capable de former des oligomères qui semblent défavoriser son activité ATPase par rapport à la forme monomérique (Karst et al., 2009). YdiB s'autophosphoryle *in vitro* sur la Sérine et la Thréonine notamment, et phosphoryle *in vitro* une protéine codée par un gène appartenant au même opéron qu'*ydiB*, YdiE, potentiellement impliqué dans la synthèse d'un ARNt modifié. YdiB semble également impliquée dans la résistance au stress oxydatif (El-Khoury et al., 2020; Nguyen et al., 2017).

Les homologues d'YdiB chez *S. pneumoniae* et *E. coli* montrent également une activité kinase *in vitro* et une organisation structurale prédite similaire. Il a été donc proposé que YdiB et ses homologues chez *S. pneumoniae* et *E. coli* appartiennent à une nouvelle famille de protéine-kinases, très largement représentée dans le monde bactérien, mais inexistante chez les Eucaryotes, ce qui leur a valu le nom d'UbK (*Ubiquitous bacterial Kinase*) (Nguyen et al., 2017). De plus amples informations sur la fonction biologique d'UbK chez *S. pneumoniae* seront données dans ce manuscrit, issues de mes travaux de thèse.



**Figure 12 : Modélisation de la structure des protéines à P-loop.** A. Structure de la GTPase EF-Tu (Code PDB : 1EXM). B. Modélisation d'YdiB (code PDB : 5NP9). C. Structure de l'ATPase RecA (Code PDB : 1U94). Les domaine Walker A sont représentés par un brin bêta côté N-terminal et une hélice alpha côté C-terminal liés par la boucle P-loop (en rose). Les brins adjacents à celui du Walker A sont représentés en orange, rose et noirs. Les résidus conservés sont représentés en structure à bâton (rouge, jaune et vert), l'ADP en bleu et les molécules d'eau par des sphères bleues. YdiB possède une structure « hybride » unique avec quatre feuilletts bêta comme pour RecA, mais dont le dernier est antiparallèle comme celui d'EF-Tu (en rose). Les résidus mis en évidence sont les acides-aminés conservés impliqués dans les motifs signatures couramment retrouvés dans les ATPases/GTPases. Adapté de (Nguyen, 2012).

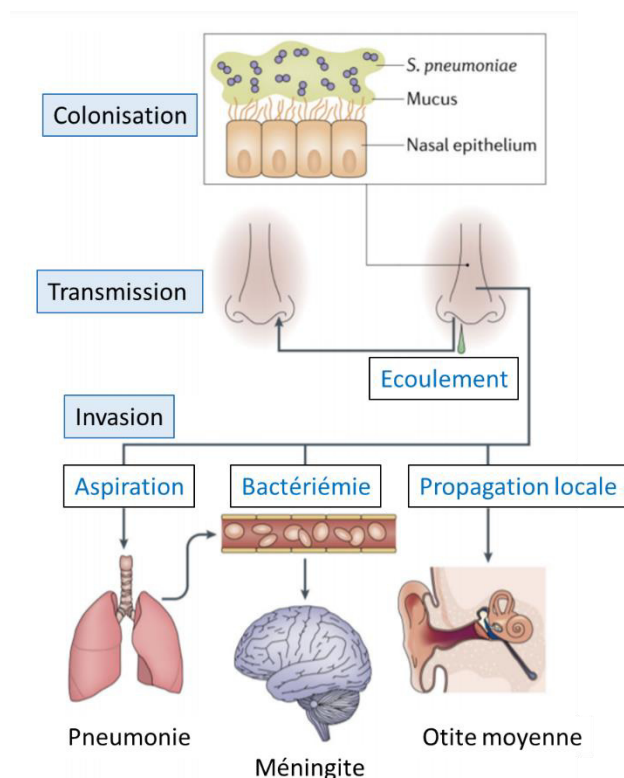
## II. La bactérie *Streptococcus pneumoniae*

### 1. Caractéristiques biologiques du pneumocoque

#### 1.1. Description générale de *S. pneumoniae*

Le pneumocoque est une bactérie pathogène pour l'homme. Il provoque des infections des voies respiratoires légères comme les otites moyennes et les sinusites, ou des

maladies plus sévères telles que les pneumonies, voire des septicémies et méningites (Henriques-Normark & Normark, 2010). Il est responsable de la mort de plus d'un million et demi de personnes par an et touche particulièrement les jeunes enfants, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées (WHO, 2015). Le pneumocoque peut cependant vivre de manière asymptomatique dans le nasopharynx chez l'homme et partager sa niche avec d'autres pathogènes respiratoires, notamment le méningocoque *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae*. Ces micro-organismes ont des caractéristiques communes dont la capacité à lyser en phase stationnaire, à être naturellement transformables et à utiliser le même schéma d'infection, des poumons jusqu'au sang et au cerveau (Thornton et al., 2010). La propagation de *S. pneumoniae* d'une personne à l'autre s'effectue par le biais d'aérosols avant la colonisation du nasopharynx. Sous l'influence de certains facteurs encore méconnus, la bactérie migre vers différents organes tels que les oreilles et les sinus, les poumons, mais également dans le sang et éventuellement le cerveau en traversant la barrière encéphalique (Figure 13).



**Figure 13 : Colonisation par la bactérie pathogène *S. pneumoniae*.** Le pneumocoque colonise le mucus des voies respiratoires supérieures et se propage par les aérosols et les écoulements nasaux pour coloniser le nasopharynx dans lequel il peut rester de manière asymptomatique. Sous l'influence de certains facteurs, il colonise les oreilles, les sinus et/ou les poumons et peut être responsable d'otites, de sinusites, et/ou de pneumonies. Il peut également gagner la circulation sanguine et éventuellement passer la barrière encéphalique pour provoquer des méningites. Extrait de (Weiser et al., 2018).

La vaccination a permis de considérablement réduire les maladies causées par les pathogènes de la niche comme *H. influenzae* ou *N. meningitidis*, et *S. pneumoniae*. Cependant,

le pneumocoque continue d'échapper aux vaccins actuels et s'adapte à la pression de sélection en modifiant ses sérotypes capsulaires. Le pneumocoque compte aujourd'hui plus de 90 sérotypes (WHO, 2018). De plus, ce pathogène développe au fil du temps de multiples résistances aux antibiotiques (Tacconelli et al., 2017). Le pneumocoque constitue donc un problème de santé publique majeur, ce qui nécessite de développer de nouveaux traitements. Cette stratégie requiert d'améliorer la compréhension de la biologie du pneumocoque afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

*S. pneumoniae* est une bactérie anaérobie aérotole'ante qui peut être cultivée dans des géloses additionnées de sang. Les colonies sont entourées d'une zone claire, directement autour de la colonie, qui correspond à la lyse complète des globules rouges, nommée  $\beta$ -hémolyse (Figure 14A). La partie claire est entourée d'une seconde partie verdâtre qui correspond à la zone d' $\alpha$ -hémolyse au sein de laquelle l'hémoglobine est dégradée de manière incomplète en biliverdine (Figure 14A) (Popoola, 1972). Ces zones traduisent la libération entre autres d'une toxine par le pneumocoque, qui sera décrite dans la partie II.1.2.3. de ce chapitre.

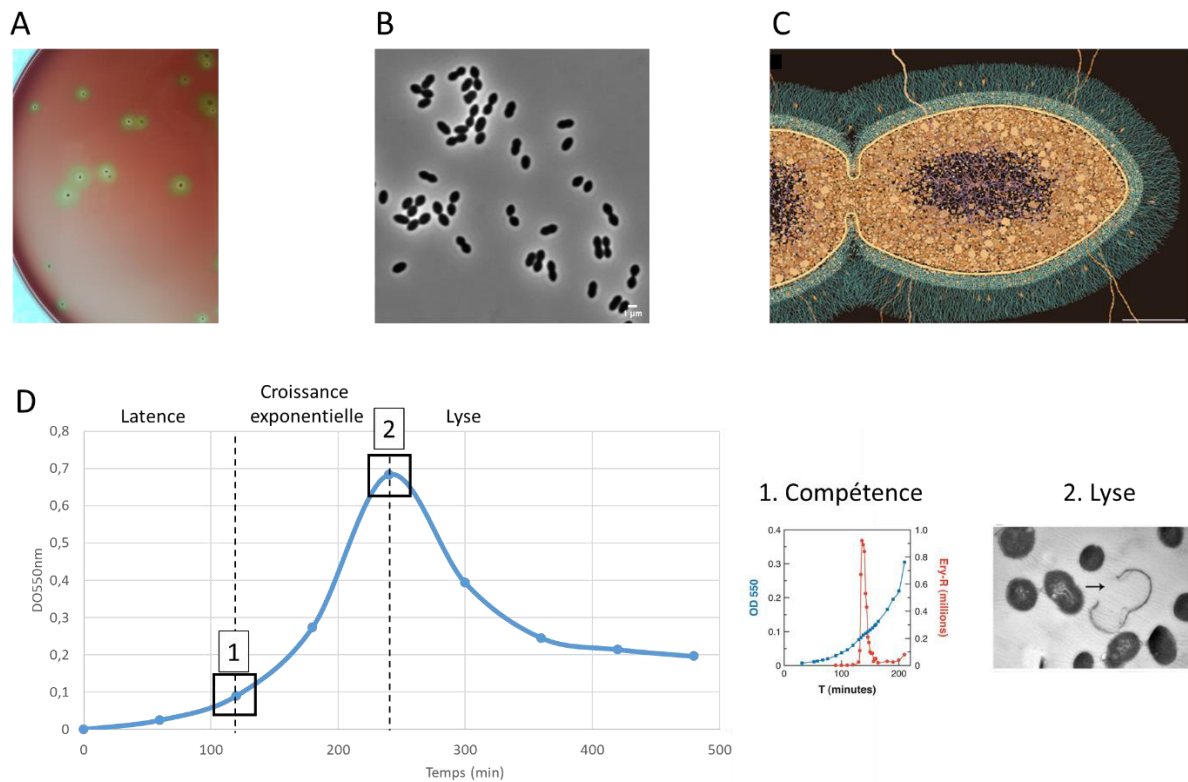
Le pneumocoque est une bactérie ovo-diplococcale d'environ 1  $\mu\text{m}$  de long. Elle est constituée de deux cellules ovoïdes, de forme souvent comparée à un ballon de rugby, qui sont reliées par un pôle (Figure 14B).

*S. pneumoniae* est une bactérie Gram positive, c'est-à-dire composée d'une paroi épaisse reposant sur la membrane plasmique, qui entoure le cytoplasme, dans lequel se trouve le nucléoïde (Figure 14C). La bactérie est recouverte d'une capsule, qui constitue le facteur de virulence principal du pneumocoque et joue un rôle important dans l'infection (voir partie 1.2.1.). Le pneumocoque se divise par fission binaire et duplique fidèlement ses constituants afin de conserver sa forme d'ovo-diplocoque et sa pathogénicité.

La croissance cellulaire du pneumocoque est particulière. En effet, après la phase exponentielle classique, le pneumocoque lyse alors que la plupart des autres espèces bactériennes restent en phase stationnaire (Figure 14D). Pendant la phase exponentielle de croissance et dans certaines circonstances, le pneumocoque peut devenir naturellement compétent pour la transformation génétique, c'est-à-dire qu'il acquiert la capacité de « capturer » de l'ADN exogène pour éventuellement l'intégrer à son génome s'il présente de



l'homologie. Ceci lui permet d'exprimer de nouvelles propriétés, comme la résistance à certains antibiotiques, ou de nouveaux sérotypes capsulaires (Hakenbeck et al., 2001; Håvarstein et al., 1997). A partir d'une certaine densité cellulaire, le pneumocoque lyse et libère son contenu dont des molécules impliquées dans la virulence (Martner et al., 2008).



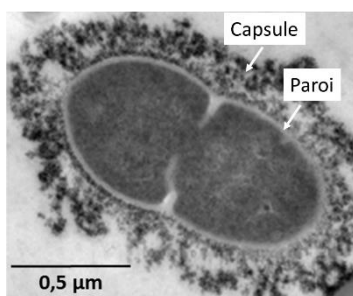
**Figure 14 : Caractéristiques générales de *S. pneumoniae*.** A. Photographie de colonies de *S. pneumoniae* étalées dans une gélose additionnée de sang. B. Microscopie optique à contraste de phase de cellules du pneumocoque. La barre d'échelle correspond à 1 μm. C. Représentation artistique d'une cellule de pneumocoque. La région centrale en violet représente le nucléoïde. Le cytoplasme et ses composés sont représentés en orange, enfermés par la membrane cellulaire en jaune. La zone en vert clair représente la paroi. Le vert foncé correspond à la capsule polysaccharidique. La barre d'échelle correspond à 150 nm. Extrait de (Engholm et al., 2017). D. Courbe de croissance du pneumocoque. *S. pneumoniae* montre une phase de latence précédant une croissance exponentielle et la lyse (courbe bleue à gauche). A  $DO_{550nm} \approx 0.1$ , le pneumocoque peut déclencher spontanément la compétence pour la transformation génétique se matérialisant sous forme d'un pic, capter et éventuellement recombiner par homologie à son génome, de l'ADN exogène conférant par exemple la résistance à un antibiotique (courbe rouge traduisant en pourcentage le nombre de cellules acquérant un marqueur de résistance à l'érythromycine en fonction du temps et de la densité). A densité optique d'environ 0,7-0,8, le pneumocoque lyse (cellule pointée par une flèche sur l'image de microscopie électronique). Courbe de croissance réalisée au laboratoire, et images adaptées de (Eldholm et al., 2010; Waters & Bassler, 2005).

Dans cette partie, je décrirai le facteur de virulence principal du pneumocoque qu'est la capsule, la protéine LytA et la pneumolysine libérées lors de l'autolyse du pneumocoque. D'autres facteurs de virulence existent, notamment des protéines de surface impliquées dans l'adhésion et la colonisation du pneumocoque lors de l'infection, mais ne seront pas détaillés dans cet exposé (Weiser et al., 2018). Dans un second temps, je détaillerai le phénomène de compétence, qui permet à *S. pneumoniae* d'acquérir de nouvelles propriétés.

## 1.2. Les facteurs de virulence

### 1.2.1. La capsule

La capsule est une couche extracellulaire de polysaccharides qui est liée à la paroi de la bactérie. Elle constitue un manteau protecteur permettant au pneumocoque de se cacher du système immunitaire (Figure 15). Elle porte des charges négatives lui permettant d'échapper à la séquestration par le mucus, qui constitue la première barrière de défense de l'hôte. En effet, les acides sialiques présents dans le mucus sont chargés négativement, au même titre que la capsule, ce qui entraîne une répulsion électrostatique et permet ainsi au pneumocoque d'accéder et de s'attacher à la surface des cellules épithéliales (Weiser et al., 2018). De plus, la capsule masque les antigènes de surface de la bactérie et la protège ainsi de la phagocytose en limitant l'activation du complément à sa surface (Hyams et al., 2010). Au cours de l'infection, la bactérie diminue l'épaisseur de la capsule pour découvrir ses molécules d'adhérence aux cellules hôtes (Weiser et al., 1994). Cette réduction proviendrait de l'autolysine LytA après activation par des peptides antimicrobiens de l'hôte (Kietzman et al., 2016).



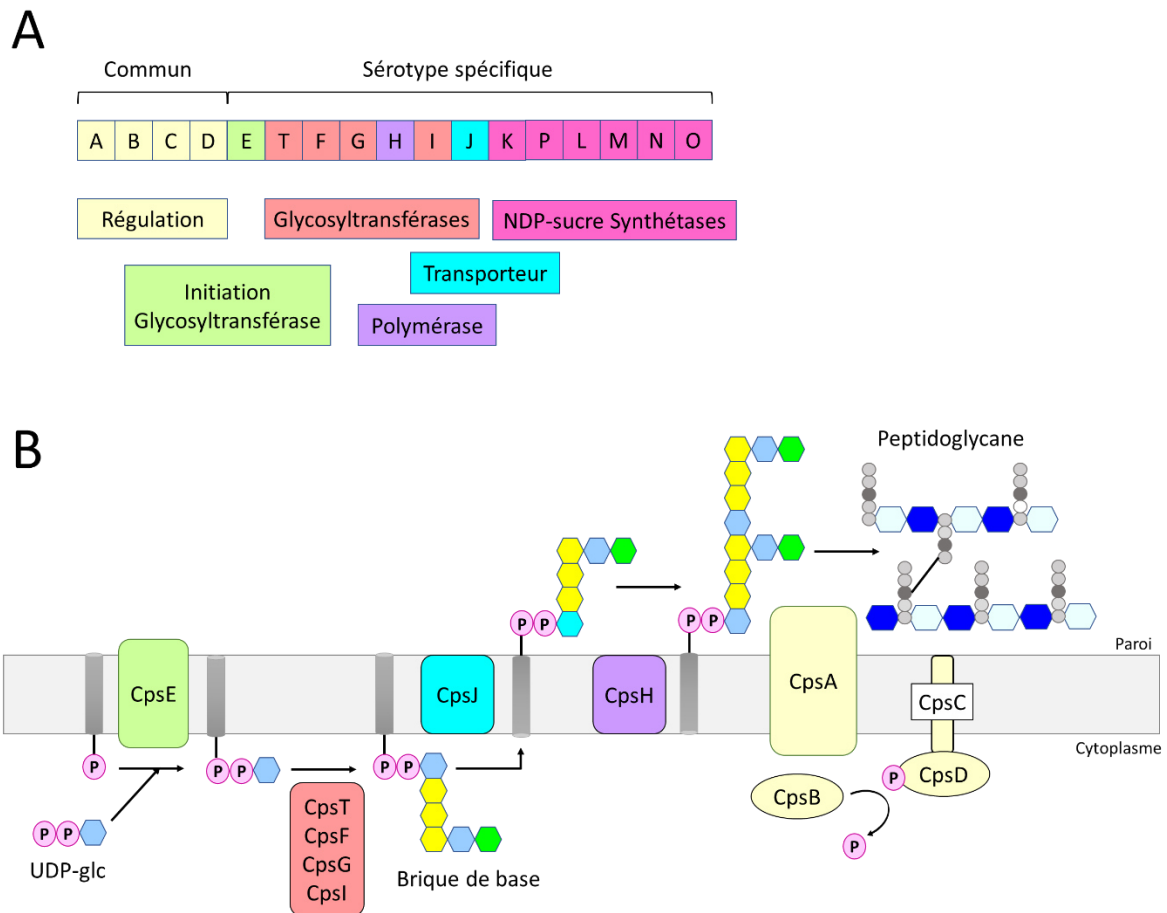
**Figure 15 : Image de la capsule de *S. pneumoniae* par Microscopie Electronique à Transmission (MET).** La paroi est visible en gris clair tout autour de la bactérie et au milieu de la cellule où se déroule la synthèse septale pour la constriction. La couche hétérogène en noir correspond à la capsule. Photographie prise au laboratoire avec la collaboration de Caroline Grangeasse.

La capsule est composée d'un assemblage d'unités répétées de deux à huit saccharides, décorées de modifications comme des O-acétylations ou de groupements additionnels tels que le pyruvate ou le phosphoglycérol (Calix et al., 2012). Les 17 gènes codant les protéines de synthèse et d'assemblage de la capsule sont regroupés dans un opéron, dit *cps* (*Capsular Polysaccharide Synthesis*), sous le contrôle d'un unique promoteur (Bentley et al., 2006). Les quatre premiers gènes, *cspA/B/C/D*, sont retrouvés dans la plupart des sérotypes et permettent la régulation de la synthèse et l'export de la capsule (Figure 16A) (Yother, 2011). Les gènes suivants sont spécifiques d'un sérotype et impliqués dans l'assemblage du polymère (Yother, 2011). Ainsi, ils contribuent à la diversité des sérotypes capsulaires (Geno et al., 2015). Par exemple, la souche de laboratoire D39 possède un sérotype de type 2, c'est-à-dire une répétition d'une unité de glucose et de trois rhamnoses, avec une chaîne latérale composée de glucose et d'acide glucuronique (Rajagopal & Walker, 2017).

La synthèse de la capsule de la souche D39 commence par le chargement de l'UDP-glucose sur l'undécaprényl-phosphate par CpsE pour l'ancrer à la membrane (Figure 16B). Les sucres constituant la brique de base sont ajoutés un à un par CpsT, CpsF, CpsG et CpsI. Le TDP-Rhamnose et l'UDP-acide glucuronique ajoutés sont produits par CpsK, CpsL, CpsM, CpsN, CpsO. Le modèle actuel propose que l'unité saccharidique soit transférée à l'extérieur de la cellule par CpsJ et polymérisée par CpsH, dont l'activité n'a néanmoins pas été démontrée chez le pneumocoque (Yother, 2011).

Une protéine importante pour la synthèse du CPS est CpsA, qui appartient à la famille des protéines LCP (LytR-Cps-Psr) exclusivement présente chez les Gram positifs. Il a été décrit chez *B. subtilis* et *S. aureus* que les protéines de cette famille sont impliquées dans l'attachement de la capsule à la paroi (Stefanović et al., 2021). Chez le pneumocoque, l'absence de *cpsA* réduit de 29% la quantité de capsule à la surface, mais ne modifie pas son attachement à la paroi (Eberhardt et al., 2012; Larson & Yother, 2017). Il a été proposé que la protéine LytR, appartenant également à la famille LCP, module l'attachement de la capsule à la paroi. La délétion de *lytR* conduit à la présence d'environ la moitié de la capsule dans le surnageant de culture, de la même manière qu'un double mutant  $\Delta cpsA \Delta lytR$  (Eberhardt et al., 2012; Ye et al., 2018). Puisque les protéines de la famille LCP possèdent des fonctions redondantes, il a été proposé que le rôle de maintenance de niveaux normaux de capsule et

sa rétention à la paroi pourrait être relayé entre CpsA et LytR, par un mécanisme encore mal connu (Stefanović et al., 2021).



**Figure 16 : Mécanisme de synthèse et d'assemblage de la capsule du type 2 chez *S. pneumoniae*.** A. Opéron des gènes de la synthèse et de l'assemblage de la capsule. Les gènes en jaune sont ceux impliqués dans la régulation et communément retrouvés dans la plupart des sérotypes capsulaires. Les autres gènes sont spécifiques d'un sérotype et ici impliqués dans l'initiation et le déroulement du processus de glycosyltransfert (en vert et en rouge respectivement), la polymérisation (en violet), la synthèse de NDP-sucre (en rose). B. Modèle de synthèse et d'assemblage de la capsule. CpsE (en vert), transfère l'UDP-Glc sur l'undécaprényl-phosphate. CpsTFGI (en rouge) ajoutent les sucres (hexagones colorés : le glucose est en bleu, le rhamnose en jaune et l'acide glucuronique en vert) constituant la brique de base de la capsule sur l'UDP-Glc fixé à la membrane. CpsJ (en turquoise) externalise la brique de base qui est polymérisée par CpsH (en violet) et assemblée à la paroi par CpsA (en jaune). Ce processus est régulé par la BY-kinase CpsCD, contrôlé par la phosphatase CpsB (en jaune). Adapté de (Nourikyan et al., 2015; Yother, 2011).

La biosynthèse de la capsule est finement régulée, et notamment coordonnée au cycle cellulaire *via* la protéine-kinase CpsD au niveau du site de division. Je détaillerai cette

coordination dans la partie III. De plus, certains signaux sont connus pour réguler la production de la capsule. Par exemple, la détection de l'oxygène dans le milieu par la pyruvate oxydase SpxB adapte la production capsulaire à l'environnement (Carvalho et al., 2013).

### 1.2.2. *LytA*

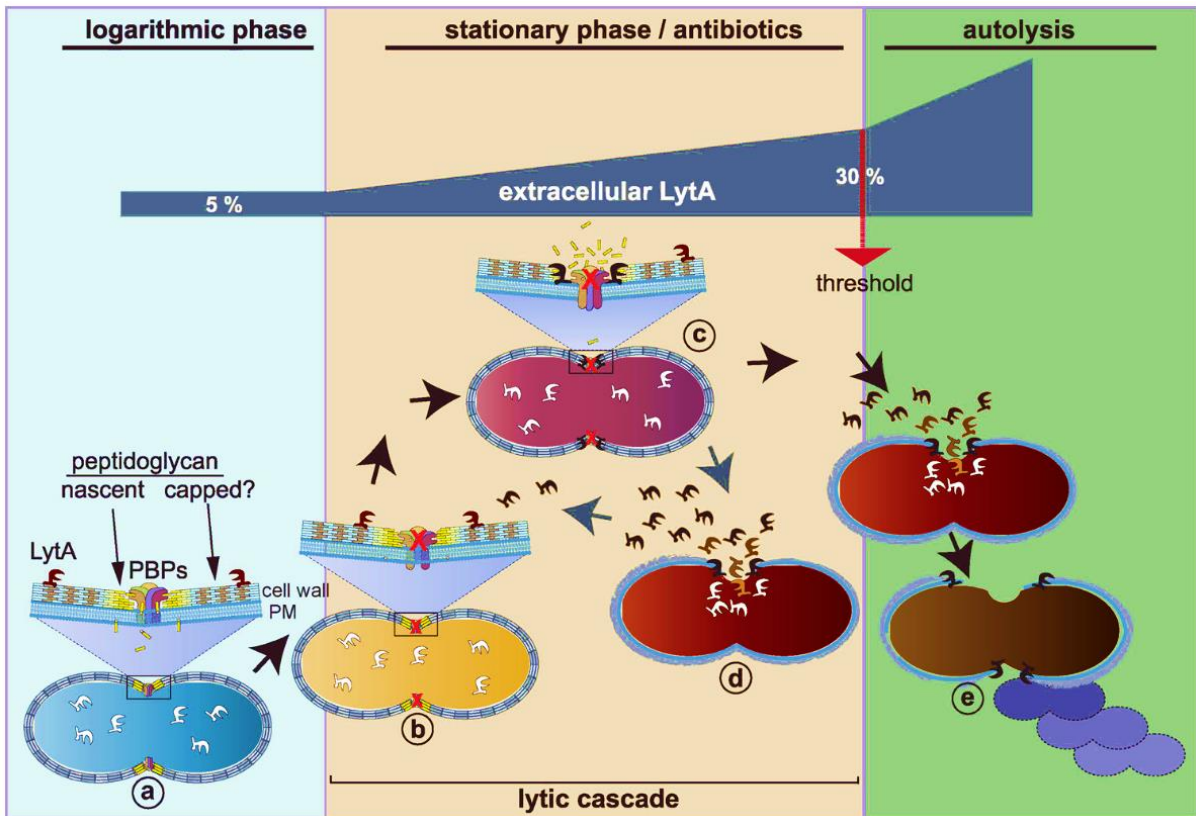
La lyse cellulaire permet la libération du contenu cytoplasmique, dont des facteurs de virulence pour promouvoir la colonisation et échapper au système immunitaire. L'autolyse majeure responsable de la lyse est *LytA*, une hydrolase qui clive spécifiquement le peptidoglycane (voir partie sur le remodelage de la paroi II.2.1.5.) (Mellroth et al., 2012). Un mutant  $\Delta$ *lytA* est à la fois incapable de lyser en phase stationnaire, et résistant aux  $\beta$ -lactames qui ciblent et inhibent la synthèse de la paroi (Sanchez-Puelles et al., 1986).

La structure de *LytA* a été caractérisée et montre un domaine N-terminal amidase permettant l'hydrolyse du peptidoglycane, et un domaine C-terminal CBD (*Choline Binding Domain*) liant la choline des acides téichoïques présents dans la paroi de manière non covalente et réversible (Bonnet et al., 2018; Li et al., 2015). De manière surprenante, contrairement aux protéines liant la choline CBPs (*Choline Binding Protein*), *LytA* ne possède pas de séquence de sécrétion alors qu'elle agit à l'extérieur de la cellule.

Un modèle a été proposé selon lequel l'entrée en phase stationnaire, ou la présence d'antibiotiques inhibant la croissance, provoquerait une inactivation de la machinerie de synthèse de la paroi, et laisserait le peptidoglycane naissant non mûri à « disposition » de l'hydrolase *LytA* (Figure 17) (Bonnet et al., 2017). La libération de *LytA* dans le milieu conduirait à sa fixation sur d'autres cellules au septum, et provoquerait une cascade de lyse jusqu'à atteindre une concentration seuil de *LytA* extracellulaire conduisant à l'autolyse généralisée (Bonnet et al., 2018; Mellroth et al., 2012).

### 1.2.3. *La pneumolysine*

La toxine pneumolysine (Ply) est libérée par lyse des cellules et est un facteur majeur de la virulence du pneumocoque. Cette protéine appartient à la famille des CDCs (*Cholesterol-*



**Figure 17 : Modèle de l'autolyse médiée par LytA.** a) En phase exponentielle de croissance, une petite partie de LytA est associée à la paroi mais n'induit pas la lyse car le peptidoglycane est « coiffé » par le biais de modifications lors de sa maturation et ainsi protégé. b) L'entrée en phase stationnaire ou la présence d'un antibiotique ciblant la paroi conduisant à l'inactivation de la machinerie de synthèse de la paroi, exposerait le peptidoglycane naissant non mûré, le rendant « disponible » pour LytA (c) et conduirait à la lyse de la cellule et au relargage de LytA dans le milieu (d). e) L'hydrolase se fixe sur les cellules voisines et induit leur lyse jusqu'à atteindre un seuil d'environ 30% (soit 0.5 µg/mL) de LytA extracellulaire qui conduit à la lyse dans l'ensemble de la culture. Extrait de (Mellroth et al., 2012).

Dependant Cytolysines), c'est-à-dire qu'elle lie le cholestérol des membranes des cellules eucaryotes et forme des pores par oligomérisation, causant ainsi la lyse des cellules eucaryotes (Tilley & Orlova, 2005). La pneumolysine permet au pneumocoque l'accès aux nutriments de la cellule hôte lors de la colonisation, mais stimule aussi la réponse inflammatoire de l'hôte (Kadioglu et al., 2008; Paton et al., 1993; Rubins & Janoff, 1998).

La pneumolysine est une protéine cytoplasmique dont le mécanisme de libération est mal connu et controversé. Ply ne possède pas de séquence signal d'export couramment retrouvé dans la famille des CDCs et serait libérée lors de l'autolyse médiée par LytA (García et al., 1985). Pour autant, une étude met en évidence le relargage de Ply en absence de LytA, et propose qu'elle soit exportée à la paroi *via* une séquence signal spécifique, par une voie conservée également retrouvée chez *B. subtilis* (Balachandran et al., 2001; Price et al., 2012). D'autres travaux ont lié la libération de Ply à la production de peroxyde d'hydrogène par la pyruvate oxydase SpxB, de manière indépendante de LytA (Bryant et al., 2016).

### 1.3. La transformation naturelle chez *S. pneumoniae*

#### 1.3.1. La compétence

L'incroyable plasticité génomique du pneumocoque dépend principalement de sa capacité à intégrer de l'ADN exogène dans son génome par recombinaison homologue pour acquérir de nouvelles propriétés d'adaptation rapide aux changements de conditions environnementales (Straume et al., 2014). La compétence est un état physiologique qui se développe spontanément dans une fenêtre restreinte d'environ 40 min pendant la phase exponentielle de croissance, et dont l'induction répond à des mécanismes qui ne sont pas encore totalement connus (Johnsborg & Håvarstein, 2009). Il a été montré que certains stress, par exemple la présence d'antibiotiques en concentration sub-optimale, peuvent être à l'origine de son déclenchement (Prudhomme et al., 2006).

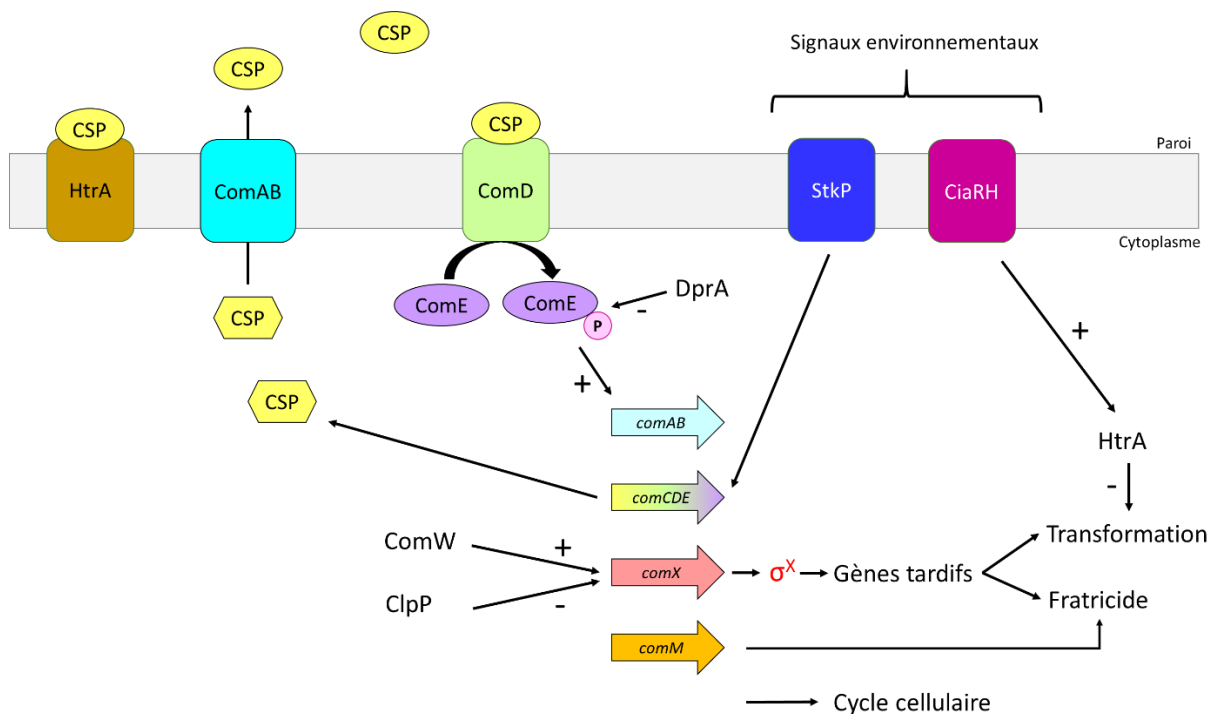
Chez le pneumocoque, il est admis que l'ensemble des cellules de la population devient compétent. Les bactéries sont synchronisées sous l'effet d'une phéromone peptidique nommée CSP (Competence Stimulating Peptide), qui est maturée et exportée dans le milieu extérieur par le transporteur ComAB (Figure 18). Le CSP lie le récepteur Histidine kinase ComD

d'un système à deux composants, située à un pôle de la cellule, qui s'autophosphoryle sur un résidu Histidine, et phosphoryle à son tour le régulateur de réponse membranaire associé ComE sur un résidu Aspartate. Les dimères de ComE phosphorylés quittent le pôle cellulaire pour stimuler la transcription des gènes dits précoces de la compétence, parmi lesquels ceux du CSP (*comC*), de ComAB, de ComD et ComE, pour générer une boucle de rétrocontrôle positive produisant le CSP en masse (Figure 18) (Pestova et al., 1996; Straume et al., 2014). Le facteur alternatif sigma X  $\sigma^X$  est le produit des deux gènes *comX1* et *comX2*, transcrits également précocement sous l'effet de ComE phosphorylée lors de la compétence. Le facteur  $\sigma^X$  induit l'expression des gènes dits tardifs de compétence, dont des gènes codant pour des protéines impliquées dans les processus de transformation génétique et de fratricide notamment (Johnsborg & Håvarstein, 2009). Le fratricide correspond à la lyse des cellules non compétentes par les cellules compétentes, et ne sera pas détaillé ici. La production de  $\sigma^X$  subit une régulation très fine pour empêcher son accumulation en absence de hauts niveaux d'expression de *comCDE*, afin que l'expression des gènes de la compétence n'ait lieu de manière anarchique (Johnsborg & Håvarstein, 2009). Notamment, la protéine ComW, dont l'expression est contrôlée par ComE, stabilise  $\sigma^X$  pour son activation et par conséquent, contrôle l'expression des gènes tardifs. La protéase ClpP participe à la dégradation de ComX et ComW (Figure 18) (Sung & Morrison, 2005; Piotrowski et al., 2009).

L'induction de la compétence provoque un arrêt transitoire de la croissance, et plus précisément un délai de la constriction du fait de la présence de la protéine ComM, produite précocement lors du développement de la compétence. Ce délai permet l'achèvement de la transformation génétique et la résolution des dimères de chromosomes intermédiaires lors de la recombinaison homologue. Des hypothèses suggèrent l'implication de ComM dans la protection de la cellule lors de dommages à l'ADN et/ou un rôle de contrôle entre la division cellulaire et la ségrégation des chromosomes (Bergé et al., 2017). Par exemple, lors de dommages à l'ADN dus à des antibiotiques comme la mitomycine, le système SOS de réparation de l'ADN est déclenché chez *E. coli*. Les gènes de réparation de l'ADN sont ainsi activés, permettant notamment la production de la protéine RecA, impliquée dans la recombinaison homologue. Le pneumocoque ne possède pas de système SOS, mais l'induction de la compétence pourrait s'y substituer. En effet, *recA* fait parti des gènes



précoces induits lors de la compétence, et serait impliqué dans la réparation de l'ADN (Prudhomme et al., 2006).



**Figure 18 : La compétence chez *S. pneumoniae*.** La compétence est induite par l'accumulation de CSP (hexagone jaune), qui est le produit de *comC*, mûré (ovale jaune) et exporté par ComAB (squirle bleu). Le CSP mature induit le système à deux composants ComDE (squirle vert et ovale violet). La phosphorylation de ComE (phosphate P dans cercle rose) induit la boucle de rétrocontrôle positive dépendante de *comAB*, *comCDE*, de *comX* (*comX1* et *comX2*) et *comM* (flèches colorées). Les gènes *comX* codent pour le facteur alternatif sigma X ( $\sigma^X$ ) pour contrôler l'expression des gènes tardifs de la compétence nécessaires à la transformation et au fratricide. Les protéines ComW et ClpP régulent positivement et négativement respectivement le facteur alternatif sigma X, produit de *comX*. DprA agit négativement sur ComE phosphorylé. La protéine HtrA (squirle marron) dégrade le CSP extracellulaire et des protéines du transformasome pour contrôler la compétence, et est induite par le système à deux composants CiaRH (squirle rose foncé). La STPK StkP (squirle bleu foncé) participe à la régulation de la compétence. Adapté de (Straume et al., 2014).

La fermeture de la compétence est médiée par DprA, qui est induit tardivement lors de la compétence et localisée à un pôle cellulaire, en interagissant avec  $\sigma^X$ . DprA interagit ainsi avec ComE phosphorylée pour l'empêcher d'accéder à ses cibles, avec ComE non phosphorylée qui agit comme un répresseur de l'induction de la compétence sur le promoteur des gènes précoces (Johnston et al., 2020). La protéase à Sérine HtrA dégrade le CSP extracellulaire pour moduler l'induction de la compétence (Figure 18) (Straume et al., 2014).

Il a été proposé que HtrA dégrade des protéines du transformasome pour arrêter l'import d'ADN dans la cellule (Liu et al., 2019). HtrA peut également être stimulée par le TCS CiaRH pour réguler négativement la compétence à la suite d'un stress lié à la présence d'un antibiotique par exemple (Gómez-Mejía et al., 2017).

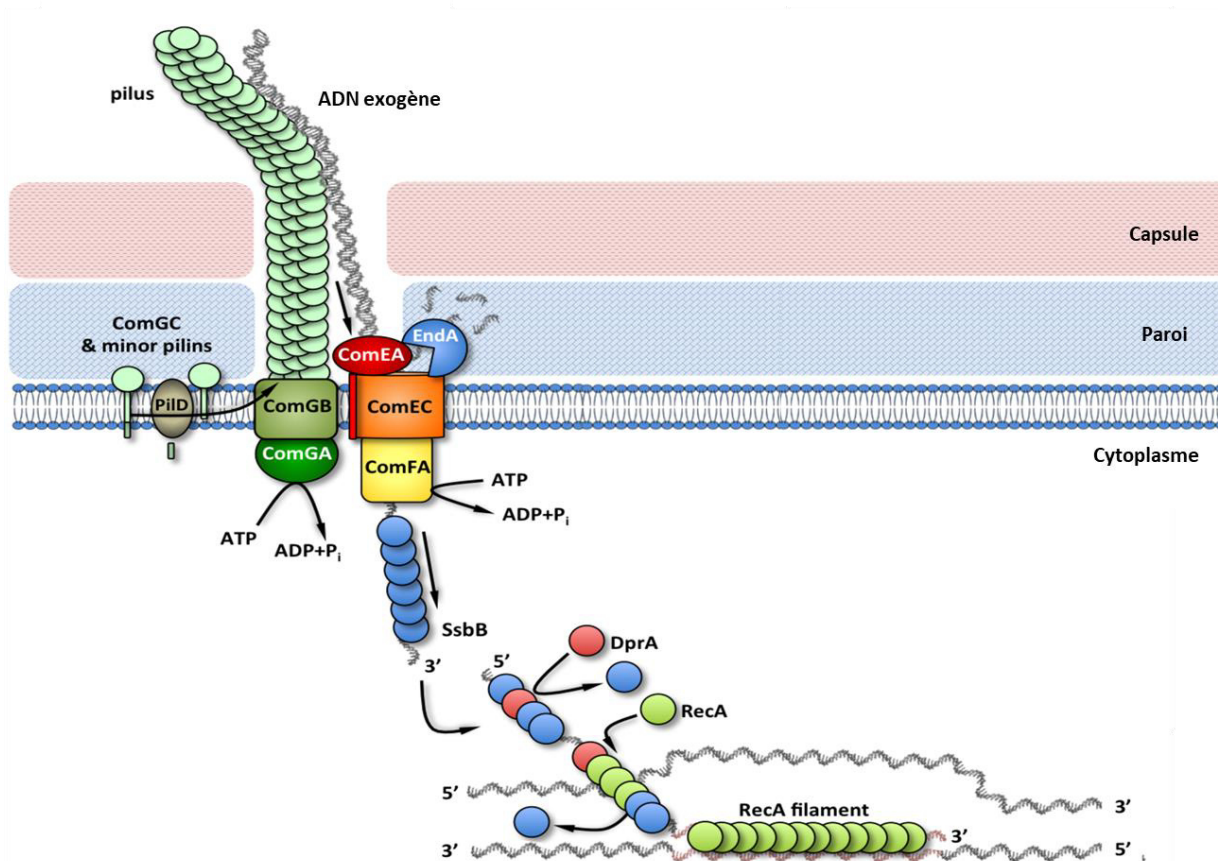
### 1.3.2. Le transformasome

Les cellules compétentes mettent en place une machinerie multiprotéique au centre de la cellule, appelée transformasome, afin de permettre l'internalisation de l'ADN à proximité du nucléoïde, favorisant ainsi la recherche d'homologie et l'intégration éventuelle au génome par recombinaison (Johnston et al., 2014).

Le transformasome possède un pilus de transformation qui capte l'ADN double brin dans le milieu environnant de la cellule compétente. Ce pilus est composé de la piline majeure ComGC, issue d'une maturation par la prépiline peptidase PilD. Il repose sur une plateforme composée des protéines ComGA-ComGB (Figure 19). Il a été proposé que le pilus réalise des cycles d'extensions et de rétractations par consommation d'ATP *via* ComGA, pour amener l'ADN capté à la membrane (Lam et al., 2021; Laurenceau et al., 2013, 2015).

L'ADN lie ensuite le récepteur ComEA, et la nucléase EndA dégrade un des deux brins de l'ADN fixé. Le brin complémentaire est transporté dans le sens 3'→5' dans la cellule par le canal ComEC. Le transport est facilité par la translocase ComFA (Figure 19) (Straume et al., 2014).

Dans le cytoplasme, les protéines SsbB lient l'ADN simple brin afin de le protéger contre les nucléases endogènes et forment le « complexe d'éclipse ». A cette étape, il est possible de constituer un réservoir d'ADN-SsbB pour optimiser les chances de transformation (Attaiech et al., 2011). Le chargeur de recombinase DprA induit la fixation de RecA sur l'ADN, qui se polymérise en une structure filamenteuse et donne une conformation étirée de l'ADN, facilitant l'échange d'ADN avec le chromosome (Figure 19) (Mortier-Barrière et al., 2007; Quevillon-Cheruel et al., 2012). L'intégration au génome se fait par recombinaison homologue, si l'homologie est suffisante, et implique les protéines CoiA et RadA (Burghout et al., 2007; Desai & Morrison, 2007). RadA est une hélicase qui interagit avec RecA pour étendre le fragment d'ADN internalisé lors de la recombinaison (Marie et al., 2017). En revanche, le mécanisme d'action de CoiA est encore mal connu.



**Figure 19. Le transformasome de *S. pneumoniae*.** Le transformasome est constitué d'un pilus qui capte l'ADN double brin, composé majoritairement de ComGC, qui repose sur une plateforme ComGA-ComGB. L'ADN double brin est pris en charge par le récepteur ComEA et la nucléase EndA dégrade un seul brin de l'ADN. L'ADN simple brin est internalisé dans la cellule *via* ComEC et ComFA, et protégé par les protéines SsbB qui recrutent RecA par le biais de DprA pour préparer la recombinaison homologue. D'après (Laurenceau et al., 2015).

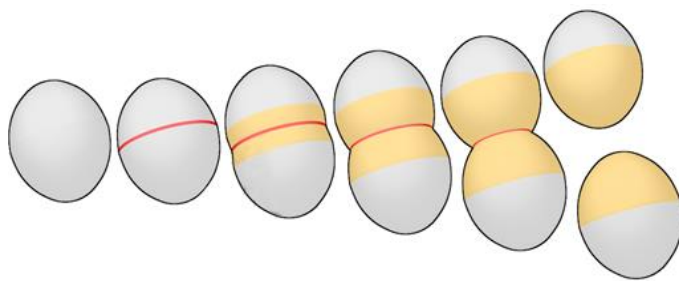
## 2. Morphogénèse et division cellulaire de *S. pneumoniae*

Le pneumocoque se divise en deux cellules filles identiques par fission binaire. Ce mode de division implique la duplication fidèle du matériel génétique. Le chromosome bactérien est ainsi répliqué et ségrégué dans chaque cellule fille. La répllication de l'ADN ne sera pas détaillée dans cet exposé mais des publications décrivent bien ce processus, particulièrement chez les organismes modèles *B. subtilis* et *E. coli* (Dewar & Walter, 2017; Jameson & Wilkinson, 2017; Pinho et al., 2013). La ségrégation des chromosomes est également bien décrite dans la littérature (Badrinarayanan et al., 2015; Le & Jalal, 2020). Chez le pneumocoque, le mécanisme

de ségrégation des chromosomes présente des particularités qui seront détaillées dans la partie III.

Lors des premières étapes de la division, la bactérie positionne le site de division où se mettra en place un complexe protéique, appelé le divisome, qui assurera la division de la bactérie. Le plus souvent, le divisome est présent au centre de la cellule (Pinho et al., 2013). Divers systèmes existent chez les bactéries pour déterminer le site de division et sont présentés dans la partie II.2.2.1.

La division du pneumocoque est semi-conservative, c'est-à-dire que la paroi néosynthétisée au centre de la cellule ne constitue que la moitié de celle la cellule fille, le reste étant hérité de la cellule mère (Figure 20).



**Figure 20 : La division cellulaire du pneumocoque.** Une cellule unique donne deux cellules filles. Le septum de division au milieu de la cellule est représenté en rouge. La paroi néosynthétisée est visualisée en orange. Extrait de (Ducret & Grangeasse, 2017).

Je présenterai dans une première partie la synthèse de la paroi, sa composition et les différents acteurs impliqués dans sa synthèse et son remodelage. Dans un second temps, je décrirai succinctement les différents systèmes de positionnement du site de division chez les bactéries, en détaillant celui de *S. pneumoniae*. Le divisome du pneumocoque, la protéine essentielle FtsZ qui le constitue, ainsi que ses protéines régulatrices, seront abordés. Enfin, je décrirai les différents modèles qui permettent de concilier coordination du cycle cellulaire et de la synthèse de la paroi.

## 2.1. Synthèse de la paroi

### 2.1.1. Composition de la paroi

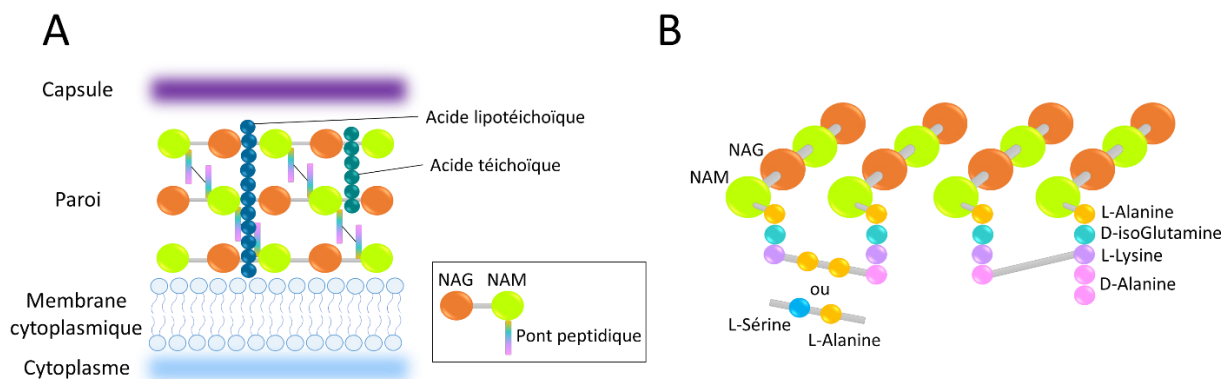
La paroi permet à la bactérie de maintenir une forme cellulaire appropriée et de résister à la pression osmotique (Rogers et al., 1980). Des réarrangements de sa structure confèrent au pneumocoque la résistance à certains antibiotiques, et plus particulièrement aux

$\beta$ -lactames, qui ont une affinité pour les PBPs (Hakenbeck et al., 2012). La composition de la paroi diffère entre les espèces bactériennes à Gram négatif et à Gram positif. Les bactéries à Gram négatif possèdent deux membranes, englobant une fine couche de peptidoglycane, alors que les bactéries à Gram positif possèdent une large couche de peptidoglycane à l'extérieur de la membrane cytoplasmique (Bartholomew & Mittwer, 1952). Dans cette partie, je ne présente que la constitution de la paroi des bactéries Gram positif, et plus particulièrement celle du pneumocoque.

Le constituant majeur de la paroi est le peptidoglycane, un polymère hétérogène qui s'assemble en larges couches à l'extérieur de la cellule. Plus précisément, le peptidoglycane est un assemblage de chaînes de sucres composées d'unités disaccharidiques répétées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Ces chaînes sont liées entre elles transversalement par des ponts peptidiques, de sorte à constituer un maillage tout autour de la cellule (Figure 21A). Ces ponts peptidiques sont associés au NAM par une de leur extrémité, et composés de cinq acides-aminés dans l'ordre suivant : L-Alanine, D-isoGlutamine, L-Lysine, D-Alanine et D-Alanine. Les deux derniers acides-aminés (D-Ala-D-Ala) peuvent être hydrolysés par des enzymes spécifiques (voir partie II.2.1.5). Alors que la plupart des acides-aminés des protéines sont de conformation L, la conformation miroir D confère une résistance vis-à-vis de protéases qui pourraient compromettre l'intégrité de la paroi. La liaison interpeptidique entre deux peptides voisins, peut être directe, entre la D-Alanine et la L-Lysine, ou indirecte (peptides dits branchés) par pontage *via* un dipeptide de L-Alanine-L-Alanine ou de L-Sérine-L-Alanine mis en place par les enzymes MurMN (Figure 21B) (Filipe et al., 2000). Elle permet de réticuler les chaînes de sucre formant ainsi un maillage entourant la cellule.

Dans le maillage de peptidoglycane se trouvent également les acides téichoïques qui sont liés de manière covalente au peptidoglycane. Les acides lipotéichoïques, sont eux, ancrés dans la membrane plasmique (Figure 21A) (Tomasz, 1967). Les acides (lipo)-téichoïques sont composés de répétitions complexes de 6 à 7 unités en moyenne, de quatre types de monosaccharides polymérisés. Ils sont exportés en dehors de la cellule pour être soit fixés à la paroi sur le NAM, soit sur une ancre lipidique pour les acides lipotéichoïques. Ils incluent des résidus de phosphorylcholine, ce qui est peu commun parmi les bactéries. Cela rend donc

*S. pneumoniae* dépendant vis-à-vis de l'apport exogène de choline dans le milieu (Tomasz, 1967). La présence de choline dans les acides téichoïques permet l'interaction avec des protéines liant la choline, dites CBP, qui vont assurer des fonctions majeures. Par exemple, l'hydrolase LytA impliquée dans l'autolyse du pneumocoque, et LytR qui participe à l'ancrage des acides téichoïques et de la capsule à la paroi ainsi qu'au cycle cellulaire (Johnsborg & Håvarstein, 2009; Mellroth et al., 2012; Stefanović et al., 2021).



**Figure 21 : Composition de la paroi du pneumocoque.** A. Schéma de la paroi. Elle est majoritairement composée de peptidoglycane constitué de chaînes de deux sucres répétés : l'acide N-acétylmuramique NAM (cercles verts) et de N-acétylglucosamine NAG (cercles orange) liés par une liaison osidique  $\beta$ -1-4 (trait gris). Les chaînes de sucres sont connectées par des ponts peptidiques (traits multicolores). La paroi fixe les acides (lipo-)téichoïques (cercles bleu foncé) et les polysaccharides capsulaires (violet). B. Détail des ponts peptidiques entre les chaînes de glycanes. Les NAM sont liés à 3 à 5 acides-aminés : L-Alanine (cercle jaune), D-isoGlutamine (cercle turquoise), L-Lysine (cercle violet) et D-Alanine (cercle rose). La liaison entre deux oligopeptides est soit directe (trait gris entre le cercle rose et violet) soit indirecte (trait gris incluant les cercles jaune et bleu correspondant à la L-Alanine et à la L-Sérine). D'après (Bruslind, 2019).

Les acides téichoïques peuvent être également alanylés, par les protéines de l'opéron *dltABCD*. L'alanylation réduirait la charge négative totale de l'enveloppe cellulaire afin d'atténuer l'interaction à des peptides antimicrobiens cationiques par exemple (Kovács et al., 2006).

La paroi ancre des facteurs de virulence, comme la capsule, mais également des protéines impliquées dans l'adhérence et la colonisation. C'est le cas des protéines neuraminidase NanA et  $\beta$ -galactosidase BgaA, qui possèdent un signal spécifique reconnu par la sortase SrtA qui les fixe au précurseur du peptidoglycane, le lipide II, puis permet leur

incorporation à la paroi par les PBPs (voir partie suivante) (Spirig et al., 2011). L'inactivation de *srtA* conduit à la libération des facteurs de virulence, et diminue l'adhésion du pneumocoque à des cellules humaines pharyngées *in vitro* (Kharat & Tomasz, 2003).

### 2.1.2. Synthèse du peptidoglycane

La synthèse du peptidoglycane est un processus complexe de plusieurs étapes qui commence dans le cytoplasme et se termine à l'extérieur de la cellule. Elle se déroule en quatre grandes étapes : la synthèse des précurseurs du peptidoglycane, l'export à travers la membrane plasmique, la polymérisation et la réticulation, et enfin le remodelage pour la maturation du peptidoglycane.

La synthèse est initiée à partir du glucose, qui rentre dans la cellule par le transporteur MalN-ManLM et subit des modifications par les enzymes GlmS, GlmM et GlmU pour devenir l'UDP-GlcNAc (Figure 22). Il est converti par MurA et MurB en UDP-NAM sur lequel les acides-aminés de l'oligopeptides sont ajoutés un à un par MurC, MurD, MurE et MurF. L'UDP-NAM-pentapeptide est ancré à la membrane par la protéine membranaire MraY pour former le lipide I, et converti en lipide II par ajout de NAG par MurG. Avant son transfert dans le milieu extérieur, le peptide fixé à NAM peut être modifié afin de contribuer à la diversité structurale du peptidoglycane : d'une part les enzymes MurT/GatD peuvent convertir le D-Glu incorporé par MurD en D-isoGln ; d'autre part les enzymes MurM/MurN peuvent rajouter un branchement dipeptidique impliqué dans le pontage des chaînes de sucre (Figure 21B) (Filipe et al., 2001; Morlot et al., 2018).

Le transport du lipide II à travers la membrane a initialement été attribué aux protéines SEDS (*S*hape, *E*longation, *D*ivision and *S*porulation) RodA et FtsW. Cependant, des études chez *E. coli* ont démontré que la flippase MurJ serait à l'origine de ce transport, mais aucune étude n'a été menée à ce jour chez le pneumocoque (Sham et al., 2014). Il est donc vraisemblable que la protéine MurJ du pneumocoque assure la translocation du lipide II à travers la membrane. Il a également été démontré que RodA et FtsW possèdent une activité transglycosylase responsable de la synthèse de la chaîne de sucres (Meeske et al., 2016). Il n'est donc pas exclu que les SEDS puissent avoir un double rôle de transglycosylase et de

flippase (Egan et al., 2020). A l'extérieur de la cellule, le lipide II est alors pris en charge par les PBPs et les SEDS pour assurer la polymérisation des unités disaccharidiques et la réticulation.

Le peptidoglycane peut être modifié par O-acétylation et N-acétylation, du NAM ou du NAG respectivement (Vollmer et al., 2019). La O-acétylation est réalisée par Adr et permet de résister à la fois au lysozyme et à l'hydrolase LytA (Bonnet et al., 2017). La déacétylation de NAG par PgdA augmente la charge positive de la surface bactérienne et protège contre des agents microbiens cationiques (Vollmer et al., 2008; Vollmer & Tomasz, 2000). Par ailleurs, un mutant  $\Delta pgdA$ , qui empêche la N-déacétylation, est hypersensible au lysozyme en phase stationnaire et montre une virulence atténuée (Vollmer et al., 2019).

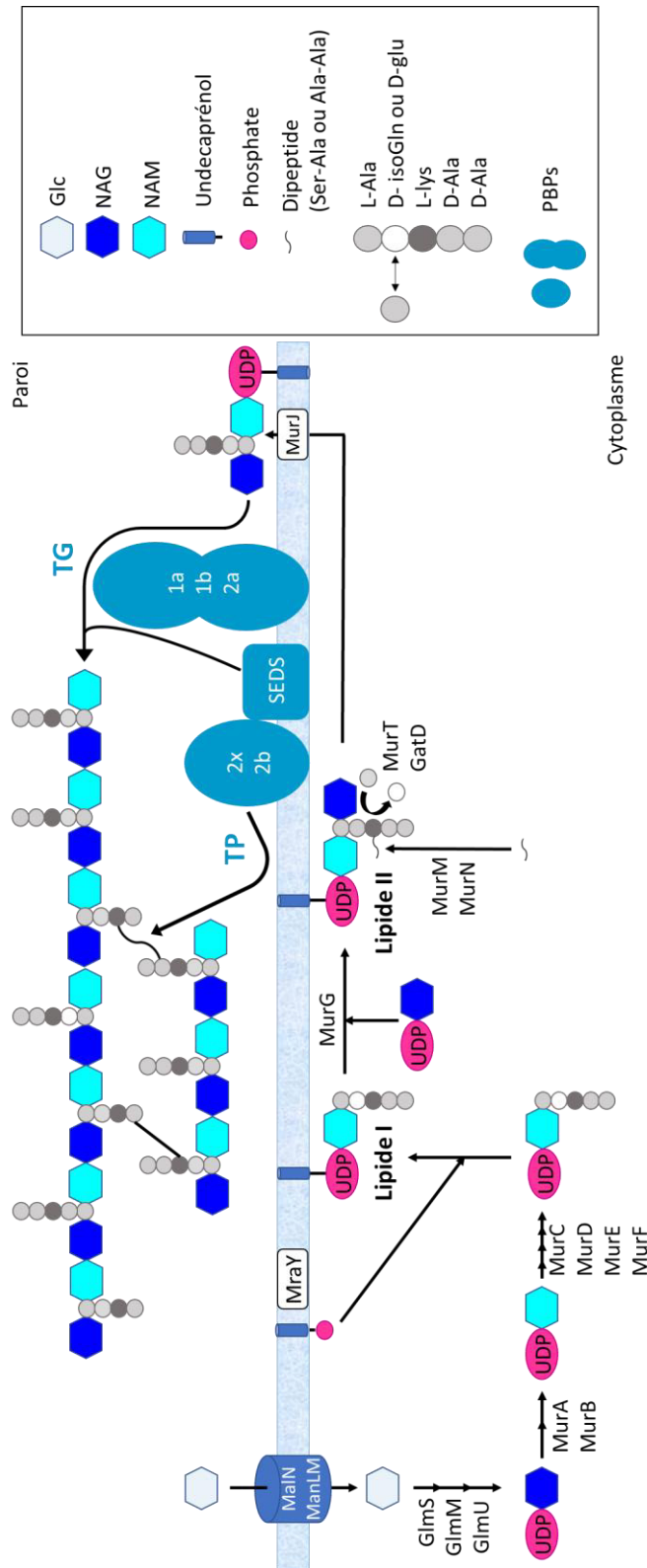
### 2.1.3. Les PBPs

Le pneumocoque possède six PBPs : cinq de haut poids moléculaire, et une de bas poids moléculaire Pbp3 (DacA). Les PBPs de haut poids moléculaire sont divisées en deux classes ; les PBPs de classe A et les PBPs de classe B, en fonction de leur activités transglycosylase TG et/ou transpeptidase TP (Tableau 1). L'activité TP permet de lier de manière covalente deux ponts peptidiques. L'activité TG permet l'ajout d'une unité disaccharidique provenant du lipide II à la chaîne préexistante du peptidoglycane en construction. Les PBPs interviennent à différents niveaux dans la synthèse de la paroi (voir partie II.2.1.2.). Ces protéines s'associent à des régulateurs qui seront présentés dans la partie suivante.

	Pbp1a	Pbp1b	Pbp2a	Pbp2b	Pbp2x
Catégorie	Classe A: Bifonctionnelles TransPeptidase et TransGlycosylase			Classe B: Monofonctionnelles TransPeptidase	
Essentialité	non			oui	
Régulateurs	CozEa/b		MacP		StkP

**Tableau 1 : Classification des PBPs de *S. pneumoniae*.** Les PBPs sont classées en fonction de leur(s) activité(s), leur essentialité et de l'existence de régulateurs connus. D'après (Fenton et al., 2017, 2018; Morlot et al., 2013; Stamsås et al., 2020; Vollmer et al., 2019).





**Figure 22 : Synthèse du peptidoglycane chez *S. pneumoniae*.** La synthèse débute dans le cytoplasme avec la synthèse du lipide I qui est converti en lipide II. Ce dernier peut subir des modifications au niveau du pentapeptide, puis est transporté à travers la membrane plasmique. Les PBPs 1a/1b/2a et les SEDS RodA et FtsW réalisent la transglycosylation (TG) entre deux sucres, et les PBPs 2b/2x vont réticuler les chaînes de sucres par leur activité transpeptidase TP entre les oligopeptides. D'après (Ducret & Grangeasse, 2021).

Les PBPs de classe B, Pbp2b et Pbp2x, sont essentielles et possèdent une unique activité TP (Kell et al., 1993). Elles fonctionnent de pair avec les SEDS ayant une activité TG afin de synthétiser de la paroi « primaire » au cours de la division cellulaire, qui serait ensuite maturée par les PBPs de classe A et les hydrolases (Straume et al., 2021). La classe A comprend les Pbp1a, Pbp1b et Pbp2a qui sont bifonctionnelles. Ces protéines transmembranaires possèdent un large domaine C-terminal extracellulaire portant les activités TP et TG. Chez le pneumocoque, les PBPs de classe A ne sont pas essentielles individuellement et des mutants de délétion de leurs gènes ne montrent pas de phénotype particulier. L'absence concomitante de *pbp1a/pbp1b* et *pbp2a/pbp1b* génère de graves défauts chez le pneumocoque. La croissance de ces mutants est retardée, avec une lyse précoce, et les cellules sont déformées, grossissent par « touffe » et présentent des septa mal positionnés (Paik et al., 1999). Cependant, le double mutant *pbp1a/pbp2a* est synthétique létal, suggérant des fonctions redondantes de ces protéines (Paik et al., 1999; Straume et al., 2021). Il a été proposé que la fonction des PBPs de classe A est de détecter et de réparer les trous et imperfections du peptidoglycane localisé en dehors des zones actives de synthèse de la paroi (Straume et al., 2021; Vigouroux et al., 2019).

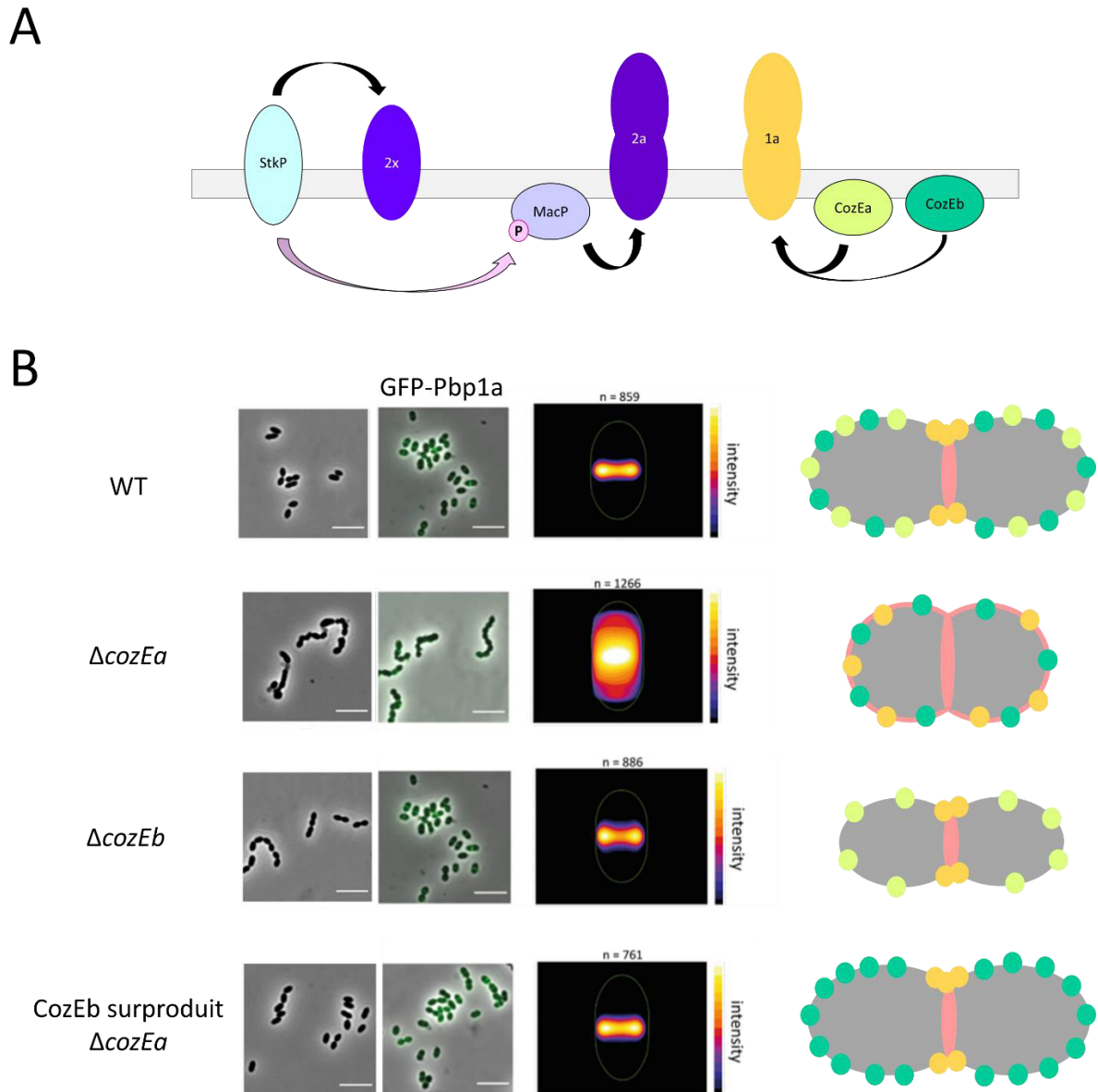
Pbp3 se distingue des autres PBPs car elle ne possède pas d'activité TP ou TG, mais une activité D,D-carboxypeptidase qui clive la D-Alanine terminale du pentapeptide pour générer des tetrapeptides (Hakenbeck et al., 1982). Ces derniers ne peuvent pas être utilisés par les PBPs de haut poids moléculaire pour réaliser la transpeptidation. Ainsi, Pbp3 contrôle la disponibilité en lipide II utilisé par les autres PBPs pour moduler la réticulation de la paroi (Morlot et al., 2004).

#### 2.1.4. Les régulateurs des PBPs

Dans le but de contrôler l'épaisseur et la réticulation du peptidoglycane, l'activité des PBPs doit être finement régulées (Figure 23A).

CozE (Coordinator of Zonal Elongation) est un régulateur de Pbp1a du pneumocoque. Les mutants de délétion de *cozE* présentent des défauts morphologiques sévères qui conduisent à la lyse des cellules. CozE interagit avec PBP1a et contribue à sa localisation

cellulaire. En effet, Pbp1a, habituellement localisée au septum de division, est délocalisée en absence de *cozE*, ce qui conduit aux défauts morphologiques observés (Figure 23B).



**Figure 23 : Régulation des PBPs chez *S. pneumoniae*.** A. Représentation schématique des PBPs et de leurs régulateurs. StkP (ovale bleu clair), MacP (ovale violet clair) et CozEa/b (ovales vert clair et foncé respectivement) régulent Pbp2x (ovale bleu), Pbp2a (ovale violet) et Pbp1a (ovales jaunes) respectivement (flèches noires). StkP phosphoryle MacP (phosphate dans l'ovale rose et flèche rose). B. Modèle de régulation de Pbp1a par CozEa/b. Images de microscopie à contraste de phase et à fluorescence des différents mutants CozE, avec les cartes de chaleurs montrant la localisation de GFP-Pbp1a. Dans le panel de droite sont représentés les modèles de localisation de Pbp1a (rond jaune), CozEa (rond vert clair) et CozEb (rond vert foncé) ainsi que de la machinerie de synthèse de la paroi (en rouge). D'après (Fenton et al., 2017, 2018; Morlot et al., 2013; Stamsås et al., 2020; Vollmer et al., 2019).

Bien que Pbp1a et Pbp2a semblent partager des fonctions redondantes, car leur absence conjointe n'est pas tolérée, l'action de CozE semble spécifique à Pbp1a. En effet, CozE n'interagit pas avec Pbp2a et son absence n'affecte pas sa localisation (Fenton et al., 2017).

Une étude phylogénique a permis de déterminer que les protéines CozE sont largement représentées au sein des espèces bactériennes. Elles sont sous-divisées en trois familles de protéines CozE, nommées respectivement CozEa, CozEb et CozEc. Deux protéines de la classe de CozEa et CozEb sont couramment retrouvées chez les *Streptococaccae* (Stamsås et al., 2020). La protéine CozE décrite appartient à la classe CozEa et sera nommée comme telle dans la suite de cet exposé. Un homologue de CozEa a été identifié chez le pneumocoque, appartenant à la famille CozEb et nommée telle qu'elle. La délétion de *cozEb* génère des petites cellules, mais n'impacte pas la localisation de Pbp1a, à l'inverse de ce qui a été observé dans un mutant  $\Delta coxEa$ . (Figure 23B) CozEb fait partie du complexe CozEa/CozEb/Pbp1a et est capable de restaurer la croissance et la morphologie cellulaire en absence de CozEa, de même que la localisation septale de Pbp1a. Ceci suggère une redondance fonctionnelle entre CozEa et CozEb de relocalisation de Pbp1a pour maintenir la forme cellulaire du pneumocoque (Stamsås et al., 2020).

Des homologues de CozEa et CozEb ont également été décrits chez *S. aureus* et sont requis pour une division cellulaire normale. Cependant, bien que CozEa et CozEb interagissent chez *S. aureus*, elles n'interagissent pas avec les PBPs mais uniquement avec EzrA, suggérant des mécanismes de régulation différents (Stamsås et al., 2018).

Un mutant  $\Delta pbp1a\Delta pbp2a$  n'est pas viable chez le pneumocoque, suggérant que ces deux protéines possèdent des fonctions redondantes. L'absence de *pbp1a* requiert donc la présence de Pbp2a pour assurer la croissance et la viabilité à sa place. Ainsi, tout mutant synthétique létal comprenant la délétion de *pbp1a* permet de caractériser un gène codant un facteur favorisant l'activité de Pbp2a. C'est ainsi qu'un second régulateur de PBP chez le pneumocoque a été identifié. Il s'agit de la protéine MacP (Membrane-anchored cofactor of Pbp2a) qui interagit avec Pbp2a au septum de division et est nécessaire à son activité (Figure 23A) (Fenton et al., 2018). La phosphorylation de MacP sur une unique Thréonine est

nécessaire pour l'activité de Pbp2a, sans toutefois moduler l'interaction entre MacP et Pbp2a (Figure 23A) (Fenton et al., 2018).

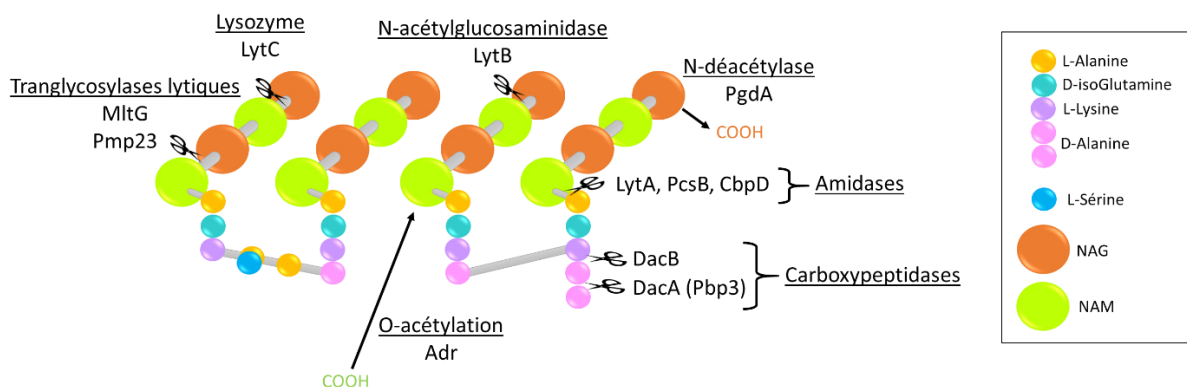
La protéine-kinase StkP contribue à la localisation de Pbp2x au septum de division mais ne modifie pas son activité (Figure 23A) (Morlot et al., 2013). Le rôle de la phosphorylation par StkP sera détaillé dans la partie III.

Les autres PBPs ne possèdent pas de régulateurs connus à ce jour.

### 2.1.5. Remodelage de la paroi

La division cellulaire nécessite non seulement la synthèse de la nouvelle paroi, mais également son remodelage. Cette maturation du peptidoglycane est essentielle pour permettre l'incorporation de nouvelle chaîne de sucre dans la paroi préexistante.

Pour cela, des hydrolases doivent dégrader spécifiquement le peptidoglycane (Figure 24). Ces enzymes sont classées en différentes familles en fonction de leur site de clivage : les glucosidases qui hydrolysent les liaisons glycosidiques, les amidases qui coupent entre NAM et le premier acides-aminé du peptide, et les endopeptidases et les exopeptidases qui hydrolysent le pentapeptide (Ducret & Grangeasse, 2021).



**Figure 24. Maturation du peptidoglycane.** Les enzymes capables de couper entre le NAG et le NAM sont les transglycosylases lytiques (MltG, Pmp23), le lysozyme bactérien LytC et la N-acétylglucosaminidase LytB. Les amidases (LytA, PcsB, CbpD) clivent le peptide entre NAM et la L-Alanine. D'autres modifications contribuent à la maturation de la paroi, comme la O-acétylation de NAM réalisée par Adr, ou la déacétylation par PgdA sur le NAG. Adapté de (Barendt et al., 2011).

- **Les carboxypeptidases :**

DacA et DacB sont des carboxypeptidases qui limitent la réticulation de la paroi. DacA, (Pbp3) clive les extrémités D-Ala-D-Ala des pentapeptides pour générer des tetrapeptides (Morlot et al., 2004). DacB agit après action de DacA, et clive quant à elle les extrémités L-Lys-D-Ala pour former des tripeptides (Vollmer et al., 2019). Les mutants de délétion de *dacA* et *dacB* montrent des défauts dans la morphologie et la septation, traduisant que la disponibilité de pentapeptide et de tetrapeptide est importante pour le remodelage de la paroi (Barendt et al., 2011).

- **Les hydrolases de la paroi :**

LytB est une N-acétylglucosaminidase sécrétée qui hydrolyse la liaison glycosidique  $\beta$ 1-4 entre le NAG et le NAM (Figure 24), avec une préférence pour les mucopeptides non réticulés (Rico-Lastres et al., 2015). Elle possède des domaines de liaison à la choline lui permettant d'interagir avec les acides téichoïques, nécessaires à son activité d'hydrolase (Rico-Lastres et al., 2015). Son absence conduit à la formation de chaînes, suggérant un rôle tardif dans la division, ce que tend à confirmer sa localisation aux pôles cellulaires dépendante de StkP (de Las Rivas et al., 2002; Zucchini et al., 2017).

MltG et Pmp23 sont des transglycosylases lytiques de la famille des lysozymes bactériens qui hydrolysent la liaison glycosidique (Figure 24). Ces enzymes de remodelage de la paroi interviennent dans le cycle cellulaire. MltG régulerait l'élongation (Winther et al., 2020) alors que Pmp23 est requise pour l'assemblage et/ou la stabilité de la machinerie de division. En effet la délétion de *pmp23* génère de grosses cellules de forme anormale avec un taux de réticulation élevé, et une mauvaise localisation de FtsZ, de Pbp2b et Pbp2x, mais aussi de MapZ (Jacq et al., 2018).

L'activité de PcsB n'a pas été caractérisé précisément mais elle agirait comme une endopeptidase ou une amidase (Figure 24). Elle est également impliquée dans la séparation des cellules filles et est recrutée au septum par les protéines FtsEX. Il a été proposé un modèle selon lequel FtsX permet la localisation au septum de PcsB et l'ATPase FtsE induit un changement conformationnel de PcsB révélant son activité hydrolytique (Bartual et al., 2014).

## 2.2. Composition et assemblage de la machinerie de division

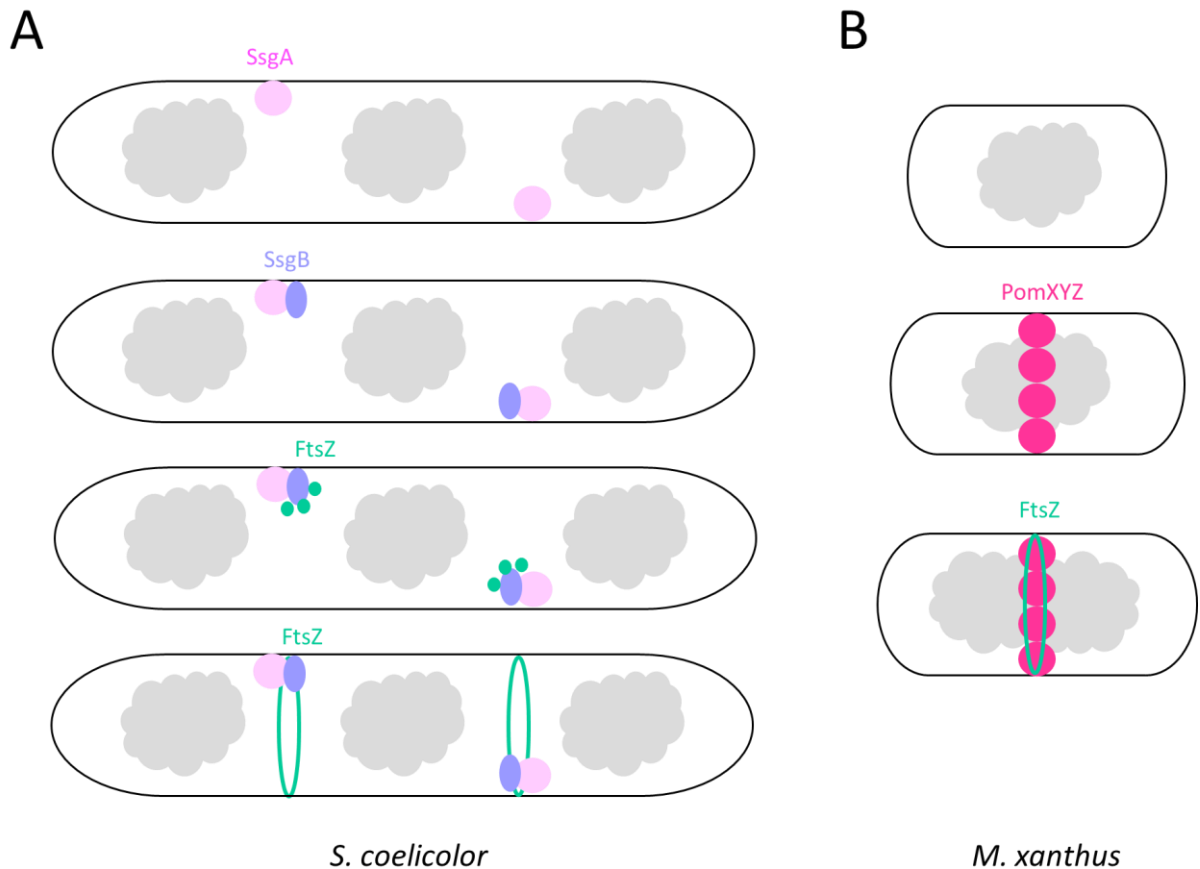
Le plus souvent chez les bactéries, l'initiation de la division cellulaire nécessite l'identification précise du centre de la cellule pour recruter la machinerie multiprotéique de division, dite divisome, à l'origine de la nouvelle paroi de la cellule fille et de leur séparation par constriction en deux cellules identiques (Adams & Errington, 2009). Une des protéines majeures de ce complexe est FtsZ (*F*ilamentous *T*emperature *S*ensitive *Z*), majoritairement conservée au sein des espèces bactériennes. FtsZ forme une structure ressemblant à un anneau (dit anneau Z) au milieu de la cellule pour réaliser la constriction et une division cellulaire optimale (Du & Lutkenhaus, 2019; Mateos-Gil et al., 2019). Son positionnement est finement régulé spatio-temporellement. Je présenterai dans cette partie les stratégies qu'ont mises en place les bactéries pour « identifier » le milieu de la cellule. Je décrirai ensuite la protéine FtsZ, et présenterai ses différents régulateurs. Enfin, je relaterai les modèles décrits de la coordination du cycle cellulaire avec la synthèse de la paroi.

### 2.2.1. Mise en place du site de division

Les bactéries ont mis en place des mécanismes pour identifier le centre de la cellule dits de positionnement négatif ou positif, qui inhibent ou favorisent respectivement la polymérisation de l'anneau Z.

Je ne détaillerai pas dans cet exposé les systèmes de positionnement négatif car ils sont absents chez *S. pneumoniae*. Brièvement, les bactéries modèles *E. coli* et *B. subtilis* ont mis en place le système Min (*M*in *C*ell) et NO (*N*ucleoid *O*cclusion), qui permettent l'assemblage de l'anneau Z au milieu de la cellule, de manière coordonnée avec la réplication et la ségrégation des chromosomes. *C. crescentus* possède la protéine MipZ qui limite la formation de l'anneau Z au milieu de la cellule où la concentration de MipZ est la plus faible. Ces systèmes sont très bien décrits dans plusieurs revues (Kiekebusch & Thanbichler, 2014; Pinho et al., 2013; Rowlett & Margolin, 2015).

Les systèmes de positionnement positif impliquent une protéine spécifique en charge de l'identification du site de division et du recrutement consécutif de FtsZ. Je décris ici quelques exemples chez *Streptomyces coelicolor*, *M. xanthus* et enfin *S. pneumoniae* (Figure 25).



**Figure 25. Schéma des systèmes de positionnement positif.** A. Système de positionnement positif chez *S. coelicolor*. La protéine membranaire SsgA (ovales rose) identifie le site de remodelage de la paroi, et recrute Ssg (ovales violets). Ce dernier recrute FtsZ (ovales verts) et favorise sa polymérisation (anneau vert). B. Système de positionnement positif chez *M. xanthus*. Les protéines PomXYZ (ovales rose foncé) forment un complexe afin de recruter FtsZ (anneau Z) au milieu de la cellule. Adapté de (Schumacher et al., 2017; Willemse et al., 2010).

#### 2.2.1.1. *SsgAB*

Le système de positionnement positif chez *S. coelicolor* dépend des protéines SsgA et SsgB. La protéine membranaire SsgA marque le site de remodelage de la paroi et donc le centre de la bactérie (Noens et al., 2007). SsgA recrute la protéine associée à la membrane SsgB, qui interagit avec FtsZ et l'ancre à la membrane. SsgB est donc responsable du recrutement de FtsZ au centre de la cellule, et pourrait favoriser sa polymérisation en anneau Z (Figure 25A) (Willemse et al., 2010). Les mécanismes moléculaires du positionnement de SsgA et SsgB ne sont pas encore bien connus.



#### 2.2.1.2. PomXYZ

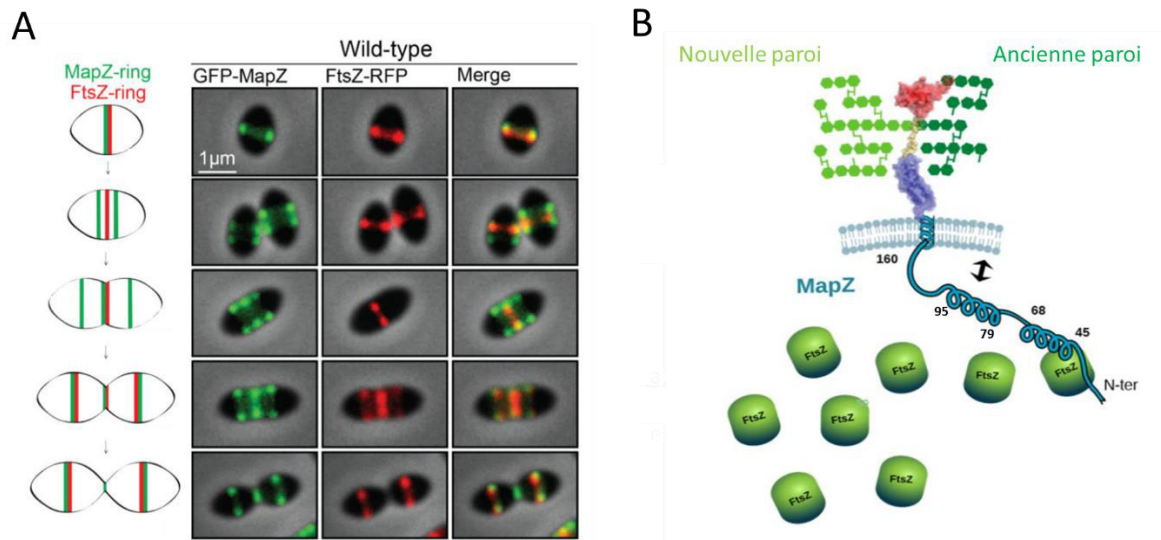
Chez *M. xanthus*, le positionnement de FtsZ est réalisé par les protéines PomX, PomY et PomZ (Figure 25B). PomZ (*Positioning at Midcell of FtsZ*), une ATPase de la famille de ParA, est capable à la fois de fixer le nucléoïde sous forme de dimère, et de s'associer au cluster protéique PomXY afin de se positionner au site de division après la ségrégation des chromosomes pour recruter FtsZ (Schumacher et al., 2017; Treuner-Lange et al., 2013). Une étude *in vivo* a démontré que le domaine N-terminal de PomX stimule l'activité ATPase de PomZ et que son domaine C-terminal régit ses interactions protéiques. La liaison de PomX à PomY favorise la formation du complexe PomXYZ, alors que son interaction avec PomZ déstabilise le complexe lors de la division (Schumacher et al., 2021).

#### 2.2.1.3. MapZ

MapZ (*Midcell Anchored Protein Z*) ou LocZ (*Localization at midcell of FtsZ*) est une protéine membranaire de *S. pneumoniae*. Elle permet l'identification du site de division pour le positionnement de FtsZ, et régule la constriction cellulaire en fonction de sa phosphorylation par StkP (voir partie III.1.) (Fleurie et al., 2014a; Holečková et al., 2014). L'absence de MapZ conduit à des défauts majeurs de localisation de FtsZ qui ne trouve pas le plan de division orthogonal, et par conséquent à des défauts de morphogénèse et de répartition des nucléoïdes fils (Fleurie et al., 2014a).

MapZ montre un profil de localisation qui varie en fonction du cycle cellulaire. Elle forme un anneau au milieu de la cellule avec FtsZ. Cet anneau se sépare ensuite en deux anneaux qui se répartissent de part et d'autre du septum de division et qui s'éloignent l'un de l'autre à la même vitesse que l'élongation cellulaire (Figure 26A). Lorsque que l'élongation est terminée, MapZ balise donc les futurs sites de division à l'équateur cellulaire, à l'interface entre l'ancienne et la nouvelle paroi. Plus tardivement lors de la division, un troisième anneau se forme au milieu de la cellule, là où se déroule la constriction (Figure 26A). MapZ est une protéine membranaire avec des domaines N-terminale cytoplasmique et C-terminale extracellulaire. L'analyse de la structure de MapZ a permis de déterminer que son extrémité C-terminale interagit avec le peptidoglycane, et se trouve de ce fait à l'interface entre l'ancien et le nouveau peptidoglycane tout au long du cycle cellulaire (Figure 26B). MapZ n'est pas

capable de lier le peptidoglycane d'autres espèces comme *E. coli* ou *B. subtilis*, ce qui suggère une reconnaissance spécifique de la paroi du peptidoglycane de *S. pneumoniae*.



**Figure 26 : Le système MapZ chez le pneumocoque.** A. Localisation de MapZ couplée à la GFP (en vert) et de FtsZ couplée à la RFP (en rouge) lors de différentes étapes du cycle cellulaire, par microscopie à contraste de phase et fluorescence et représentation schématique à gauche des images. La colocalisation des deux protéines se traduit par un signal jaune. B. Structure de MapZ à l'interface entre l'ancienne paroi (vert foncé) et la nouvelle (vert clair). MapZ possède des domaines N-terminal cytoplasmique et C-terminal extracellulaire avec un segment transmembranaire. La partie extracellulaire en bleu correspond à un sous-domaine servant de piédestal pour le sous-domaine en rouge qui se lie au peptidoglycane ; les deux sont séparés par un domaine *linker* flexible (en jaune). La partie cytoplasmique de MapZ est principalement intrinsèquement désordonnée et possède deux régions ayant tendance à former des hélices amphipathiques (des résidus 45 à 68 et 79 à 95) interagissant avec la membrane. C'est la partie très conservée et dépliée de MapZ qui interagit avec FtsZ (résidus 17 à 43). La phosphorylation de MapZ a lieu sur les résidus T67 et T78 par StkP. Extrait de (Fleurie et al., 2014a) et d'après (Hosek et al., 2020).

Le domaine N-terminal cytoplasmique de MapZ interagit avec FtsZ mais également avec la membrane. La liaison à FtsZ n'affecte pas les propriétés structurales de MapZ, dont le domaine N-terminal est intrinsèquement désordonné, et ne semble pas modifier le statut de polymérisation de FtsZ. Il a été proposé un modèle selon lequel MapZ pourrait lier alternativement FtsZ et/ou la membrane afin de permettre l'assemblage du divisome et moduler la constriction cellulaire en modifiant la fluidité membranaire au site de constriction (Hosek et al., 2020). Le domaine cytoplasmique de MapZ est phosphorylé sur deux Thréonines par StkP. Je détaillerai plus en détail le rôle de la phosphorylation de MapZ par StkP dans la partie III.1.

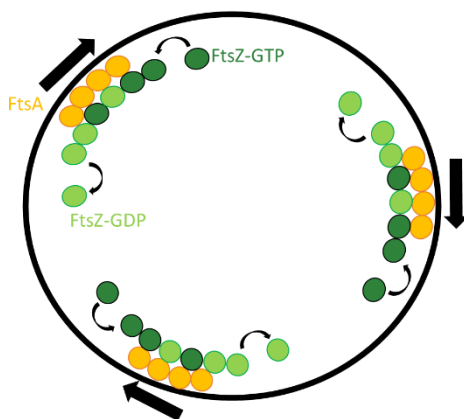
### 2.2.2. Le divisome

Une fois le centre de la cellule identifiée, la division cellulaire est réalisée par le divisome. Ce dernier regroupe plusieurs protéines impliquées dans la synthèse de la paroi et dans la constriction des deux cellules filles par l'anneau FtsZ. Dans cette partie, j'aborde uniquement les protéines du divisome de *S pneumoniae*, en particulier la protéine majeure recrutant et composant le divisome, FtsZ, ainsi que les protéines régulant sa fonction. Dans un second temps, je décris les différents modèles qui détaillent la synthèse du peptidoglycane par le divisome.

#### 2.2.2.1. FtsZ

Le recrutement et la polymérisation de FtsZ au centre de la cellule permettent la mise en place et l'organisation du complexe protéique divisome. De plus, FtsZ coordonne les synthèses longitudinale et septale de la paroi, nécessaires à l'élongation et la constriction de la cellule respectivement (Du & Lutkenhaus, 2019).

FtsZ est une GTPase homologue aux tubulines eucaryotes, conservée chez les Bactéries, qui possède la propriété de se polymériser en protofilaments par hydrolyse du GTP pour former un anneau Z. Des études ont mis en évidence que l'anneau Z formé au milieu de la cellule est discontinu (Jacq et al., 2014). Les « patches » de FtsZ sont dynamiques et directionnels. On compare l'anneau Z à un « tapis de course », au sein duquel les monomères de FtsZ-GTP sont ajoutés d'un côté, et ceux de FtsZ-GDP enlevés de l'autre, conduisant à un anneau constrictif dont le diamètre se réduit (Figure 27). (Perez et al., 2019).



**Figure 27 : Formation de l'anneau Z au milieu de la cellule.** Les monomères de FtsZ-GTP (cercles vert foncé) polymérisent en protofilaments, qui s'ancrent à la membrane par l'intermédiaire de FtsA (cercles jaunes). La dynamique de l'anneau en « tapis de course » provient de l'ajout de FtsZ-GTP d'un côté et de l'élimination de FtsZ-GDP (cercles vert clair) de l'autre. D'après (Bisson-Filho et al., 2017; Du & Lutkenhaus, 2019).

### 2.2.2.2. Les protéines régulatrices de l'anneau Z

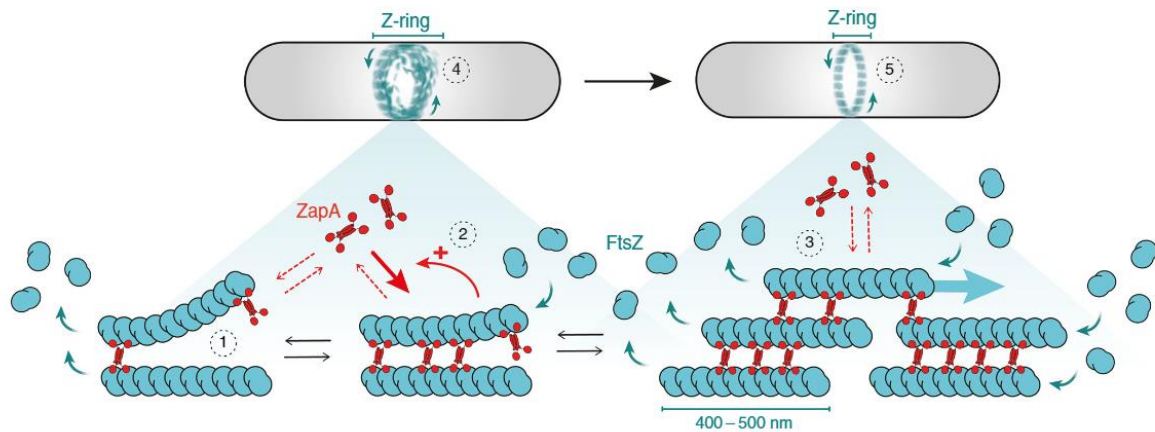
L'anneau Z est ancré à la membrane et stabilisé par différentes protéines régulatrices.

- **FtsA :**

FtsA, une protéine membranaire homologue à l'actine, ancre l'anneau Z à la membrane (Figure 27 et 29). FtsA arrive immédiatement après le recrutement de FtsZ au milieu de la cellule et est capable, comme FtsZ, de former un anneau discontinu, et de stabiliser l'anneau Z (Mura et al., 2017). La déplétion de FtsA provoque la délocalisation de FtsZ après son recrutement à la membrane. FtsA est une protéine largement répandue chez les bactéries mais dont l'essentialité semble dépendante de l'espèce. Elle est par exemple essentielle chez *S. pneumoniae* et *E. coli*, mais dispensable chez *B. subtilis*, suggérant la présence d'autres protéines ayant une fonction complémentaire et/ou similaire (Lara et al., 2005).

- **ZapAB :**

Les protéines ZapA et ZapB contribuent également à la stabilisation de l'anneau FtsZ chez plusieurs bactéries. Cependant, aucune étude n'a été menée sur leur rôle chez le pneumocoque. Il a été montré que ZapA d'*E. coli* stabilise l'anneau Z en interagissant avec FtsZ pour aligner ses protofilaments et ainsi former une structure plus ordonnée. De plus, ZapA inhibe la capacité d'hydrolyse du GTP par FtsZ et modifie sa dynamique. Il en résulte un anneau Z plus ordonné, et ainsi plus stable (Figure 28) (Caldas et al., 2019). ZapB est recrutée par ZapA, et est également capable de se polymériser pour former un anneau qui serait à l'intérieur de l'anneau Z, contribuant ainsi à la stabilisation de ce dernier (Galli & Gerdes, 2010). Par ailleurs, la protéine ZapB interagit avec la région de la terminaison de la réplication *ter* du chromosome par l'intermédiaire de MatP (*Macrodomain ter Protein*) afin de coordonner la division cellulaire avec la réplication et la ségrégation des chromosomes chez *E. coli* (Annik et al., 2016).



**Figure 28 : Régulation de l’anneau Z par la protéine ZapA.** ZapA (en rouge) lie les protofilaments de FtsZ (en bleu) (1.), ce qui facilite leur association (2.) jusqu’à formation d’un réseau de protofilaments alignés de FtsZ (3.). L’anneau Z initialement très dynamique et peu ordonné (4.), devient une structure plus alignée et plus stable (5.). Issu de (Caldas et al., 2019).

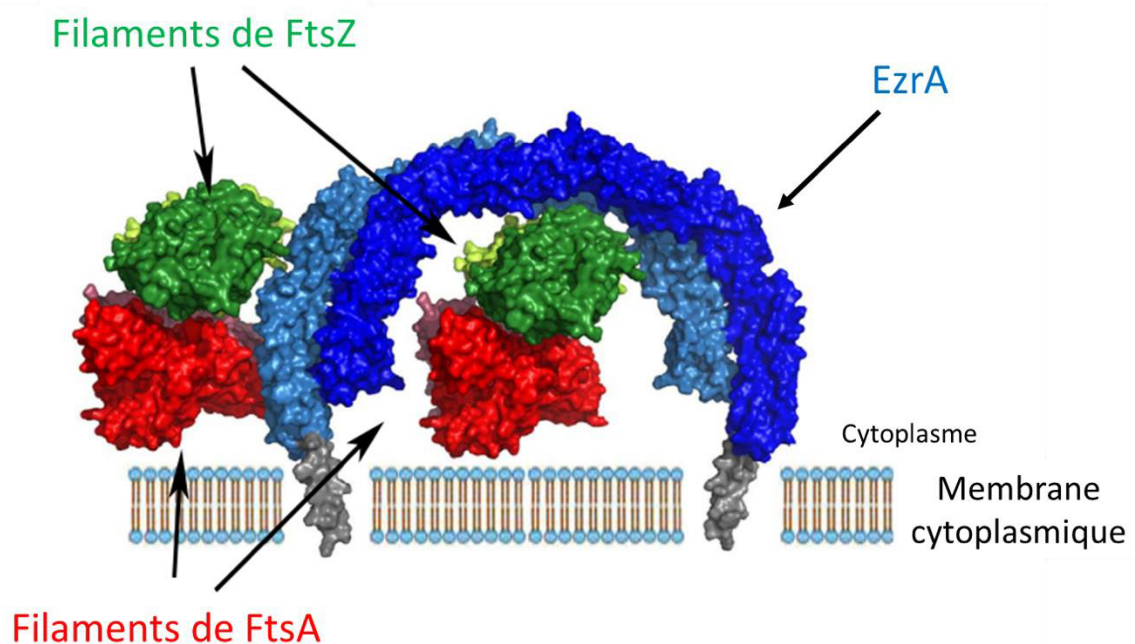
- **SepF :**

SepF (*Septum Forming*) est une protéine membranaire initialement identifiée chez *B. subtilis*, qui interagit avec FtsZ et stabilise l’anneau Z. Elle stimule la polymérisation de FtsZ et inhibe son activité GTPase pour limiter son désassemblage (Hamoen et al., 2006; Singh et al., 2008). Elle partage une fonction redondante avec FtsA, qui consiste à ancrer FtsZ à la membrane. Une étude récente chez *Corynebacterium glutamicum*, qui ne possède vraisemblablement que SepF comme régulateur de FtsZ, propose que SepF joue un rôle multiple dans la fonction et l’assemblage de l’anneau Z. D’une part, la formation de complexes FtsZ-SepF dans le cytoplasme stimulerait l’assemblage des filaments de FtsZ. Les formes homodimériques de SepF interagiraient avec les filaments de FtsZ et les ancreraient à la membrane alors que les formes polymérisées de SepF seraient impliquées dans le remodelage de la bicouche lipidique pour la formation du septum (Sogues et al., 2020).

Chez le pneumocoque, la délétion de *sepF*, génère des cellules allongées et élargies avec de multiples septa, présentant néanmoins une localisation correcte de FtsZ (Fadda et al., 2003; Mura et al., 2017). La surproduction de FtsA compense les défauts morphologiques observés dans un mutant  $\Delta sepF$  du pneumocoque, suggérant un rôle redondant entre FtsA et SepF en lien avec la constriction réalisée par FtsZ (Mura et al., 2017).

- **EzrA :**

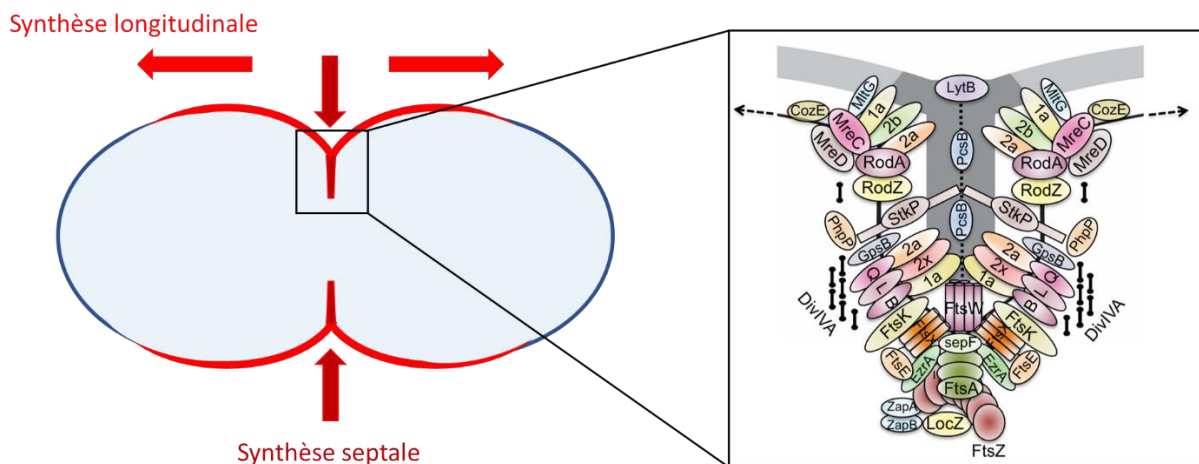
EzrA (*Extra Z rings A*) interagit avec FtsZ pour bloquer sa polymérisation en réduisant la capacité de FtsZ à lier le GTP (Chung et al., 2006). L'étude de la structure d'EzrA chez *B. subtilis* a montré qu'elle forme une arche autour de FtsZ, limitant ainsi sa polymérisation (Figure 29) (Cleverley et al., 2014). La régulation par EzrA permet ainsi d'empêcher la formation aberrante d'anneaux Z multiples. En effet, plusieurs anneaux par cellule sont présents chez *B. subtilis* dans un mutant  $\Delta ezrA$  (Levin et al., 1999). EzrA interagit avec FtsZ par sa queue C-terminale, tout comme FtsA, suggérant une compétition entre ces deux régulateurs de l'anneau Z (Singh et al., 2007). Au cours du cycle cellulaire, l'ensemble des protéines FtsZ, FtsA et EzrA migrent aux futurs sites de division préalablement définis par MapZ (Perez et al., 2019).



**Figure 28 : Modèle d'interaction d'EzrA avec FtsZ et FtsA.** Les protofilaments de FtsZ (en vert) sont ancrés à la membrane par la protéine FtsA (en rouge), capable également de former des protofilaments. EzrA forme une arche autour de FtsZ afin de limiter sa polymérisation. Les variations de couleur montrent l'implication de plusieurs monomères, avec notamment un dimère d'EzrA (bleu clair et foncé). Adapté de (Cleverley et al., 2014).

### 2.2.3. Assemblage de la paroi au cours de la division cellulaire

Le divisome permet de coordonner la synthèse de paroi, nécessaire pour l'élongation, et la constriction de la cellule (Figure 30). Ce processus doit être finement régulé pour assurer la division cellulaire et maintenir la forme caractéristique de la bactérie. Les processus d'assemblage de la paroi sont bien décrits chez les organismes modèles tels que *E. coli* et *B. subtilis* pour lesquels sont proposées deux machineries distinctes de synthèse de la paroi. Ainsi, une machinerie de synthèse longitudinale, nommée l'élongasome, assure l'élongation cellulaire, alors que le divisome permet la synthèse septale de peptidoglycane. L'élongasome correspond à un complexe multiprotéique s'organisant autour de la protéine MreB, couramment retrouvé chez les bactéries en forme de bâtonnet (bacilles), mais absent chez le pneumocoque. Le divisome est sous le contrôle de FtsZ dont l'anneau Z rétrécit progressivement au fur et à mesure de la synthèse septale. L'organisation spatiale et temporelle de ces deux machineries est gérée par des partenaires spécifiques (Egan et al., 2020).



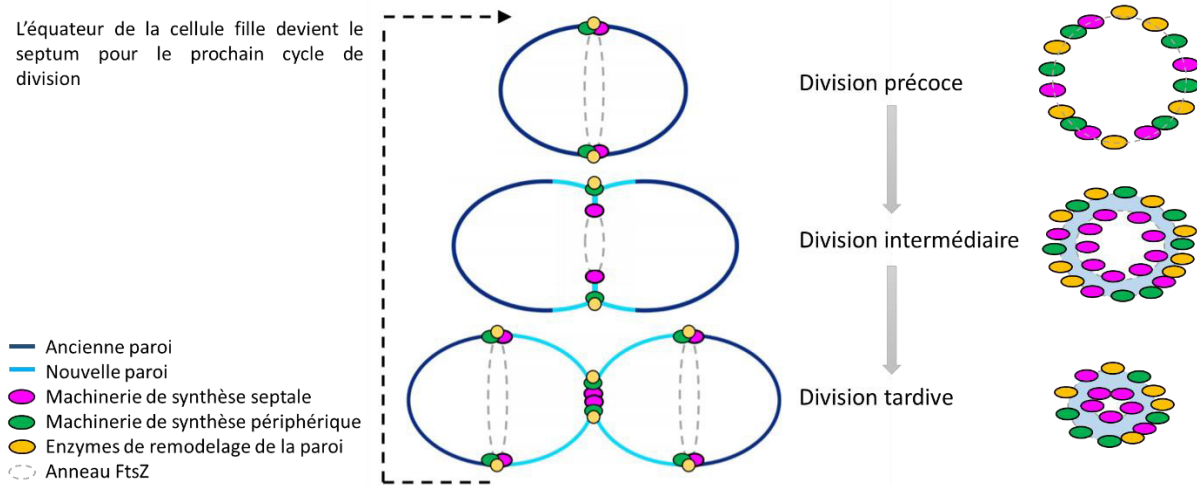
**Figure 30 : Machinerie de synthèse du peptidoglycane au cours de la division cellulaire chez le pneumocoque.** La synthèse longitudinale (en rouge) permet l'élongation cellulaire alors que la synthèse septale (en rouge foncé) permet la constriction. Le zoom dans le carré noir correspond au regroupement des protéines de la machinerie de synthèse de la paroi au milieu de la cellule. 1a, 2a, 2b, 2x correspondent aux protéines PBPs du même nom. D'après (Vollmer et al., 2019).

Le pneumocoque, de forme ovoïde, possède des protéines homologues à celles impliquées dans les systèmes décrits chez *E. coli* et *B. subtilis*. Cependant, l'absence de MreB et la rétention du système de synthèse de peptidoglycane au centre de la cellule, suggèrent

que FtsZ coordonnerait soit deux machineries distinctes permettant l'élongation et la constriction du pneumocoque, soit une seule machine qui assurerait les deux fonctions (Fleurie et al., 2014b). Dans cette partie, je présenterai donc ces différents modèles, ainsi que les plus récents développements visant à comprendre comment ils pourraient fonctionner (Trouve et al., 2021).

### 2.2.3.1. *Modèle de synthèse à deux machineries*

Un premier modèle suggère que les machineries de synthèse périphérique et septale de la paroi sont indépendantes chez le pneumocoque. Il est basé sur l'analogie avec les machineries des bactéries en forme de bâtonnet, mais également sur la localisation différenciée des protéines majeures composant ces machineries au cours du cycle cellulaire (Figure 31) (Morlot et al., 2003; Perez et al., 2020).



**Figure 31 : Modèle schématique de la synthèse du peptidoglycane par deux machineries de synthèse.** La machinerie de synthèse septale (ovales roses) permet de séparer les deux cellules filles. La machinerie de synthèse périphérique (ovales verts) et les enzymes de remodelage de la paroi (ovales jaunes) allongent les cellules filles (nouvelle paroi en bleu clair et ancienne paroi en bleu foncé). L'anneau FtsZ est représenté en cercle gris pointillé et migre aux futurs sites de division au fur et à mesure de la constriction. Les machineries de synthèse restent au septum de division jusqu'à la phase tardive de division qui correspond à la constriction. Le panel de droite représente une vue depuis l'axe longitudinal des cellules positionnées verticalement. Les machineries sont réparties en nœuds le long de l'anneau FtsZ. L'anneau septal se referme au fur et à mesure de la division cellulaire (cercle plein bleu clair). La machinerie de synthèse septale forme un anneau interne par rapport à celui contenant la machinerie de synthèse périphérique et des enzymes de remodelage de la paroi. Adapté de (Perez et al., 2020).

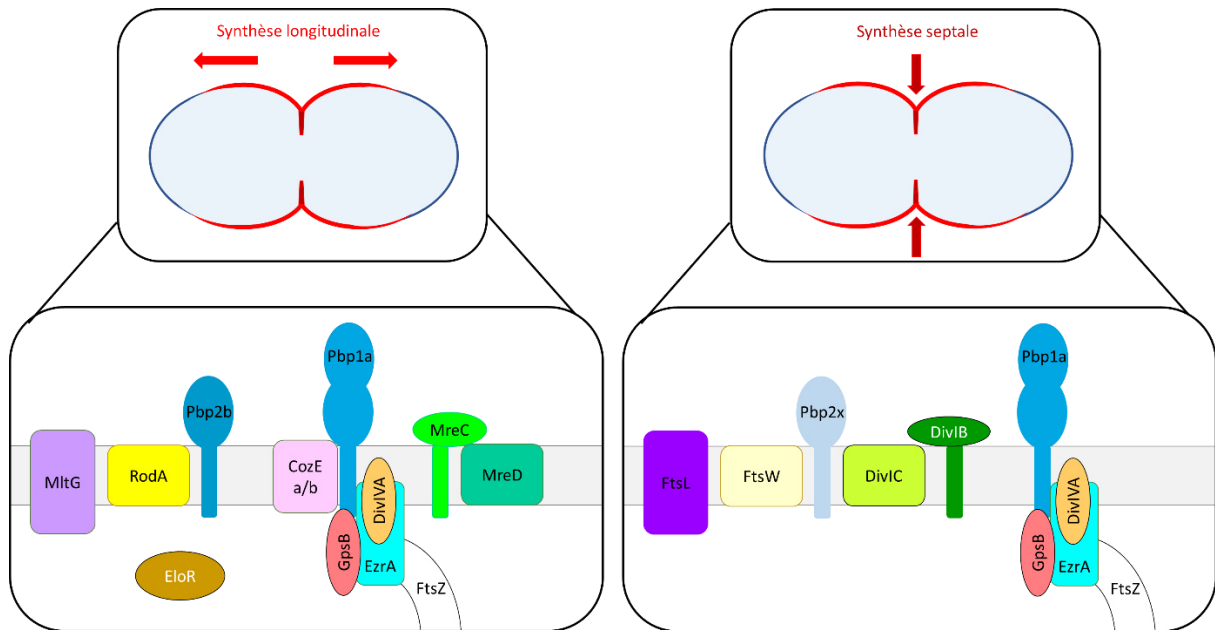


Les protéines d'assemblage du peptidoglycane s'organisent au début de la division au niveau de l'anneau Z pour réaliser la synthèse périphérique et septale. La constriction dépend de la synthèse de la paroi entre les deux cellules filles, ainsi que de la dynamique de FtsZ, dont l'anneau diminue progressivement au milieu de la cellule en fournissant l'énergie nécessaire à l'invagination de la membrane (Du & Lutkenhaus, 2019). Les hydrolases du peptidoglycane participent également à son remodelage pour séparer les deux cellules filles (Figure 24) (Massidda et al., 2013).

Chez le pneumocoque, l'élongasome est notamment composé des protéines Pbp2b, RodA, MreC et MreD (Figure 32) (Zapun et al., 2008). Pbp2b fonctionne avec sa SEDS associée RodA pour assurer la synthèse périphérique de peptidoglycane (Perez et al., 2020). En effet, la déplétion de Pbp2b conduit à de longues chaînes de petites cellules en formes de lentilles (Berg et al., 2013). Les protéines MreC et MreD dirigent la synthèse périphérique en formant un complexe qui contrôle l'activité et la localisation de Pbp1a (Land & Winkler, 2011). De plus, les protéines CozEa et CozEb (voir partie II.2.1.4.), participent au recrutement de Pbp1a et dirigent son l'activité au milieu de la cellule où elle promeut l'élongation.

L'inactivation de la transglycosylase lytique présumée, MltG, supprimerait le recrutement de l'élongasome chez *S. pneumoniae*. Il a été proposé que cette protéine enlèverait les brins de glycane naissants de leur ancre membranaire pour faciliter leur incorporation dans le peptidoglycane par Pbp2b et RodA (Tsui et al., 2016).

Le divisome, responsable de la synthèse septale et de la constriction cellulaire est composé chez le pneumocoque de Pbp2x et de la SEDS associée FtsW (Figure 32) (voir partie II.2.1.2). La déplétion de Pbp2x génère des cellules allongées en forme de citron, traduisant effectivement un rôle dans la septation (Berg et al., 2013). Chez *E. coli*, il a été démontré qu'un complexe tripartite est formé par les protéines FtsQ, FtsB et FtsL au septum de division. Le recrutement de ces protéines dépendrait de FtsK, décrite comme une translocase à ADN, qui connecterait la division cellulaire à la ségrégation des chromosomes (Buddelmeijer & Beckwith, 2004). Les homologues des protéines FtsQBL chez le pneumocoque forment un complexe *in vitro* avec Pbp2x et FtsW, mais leurs rôles ne sont pas bien connus (Philippe et al., 2014).



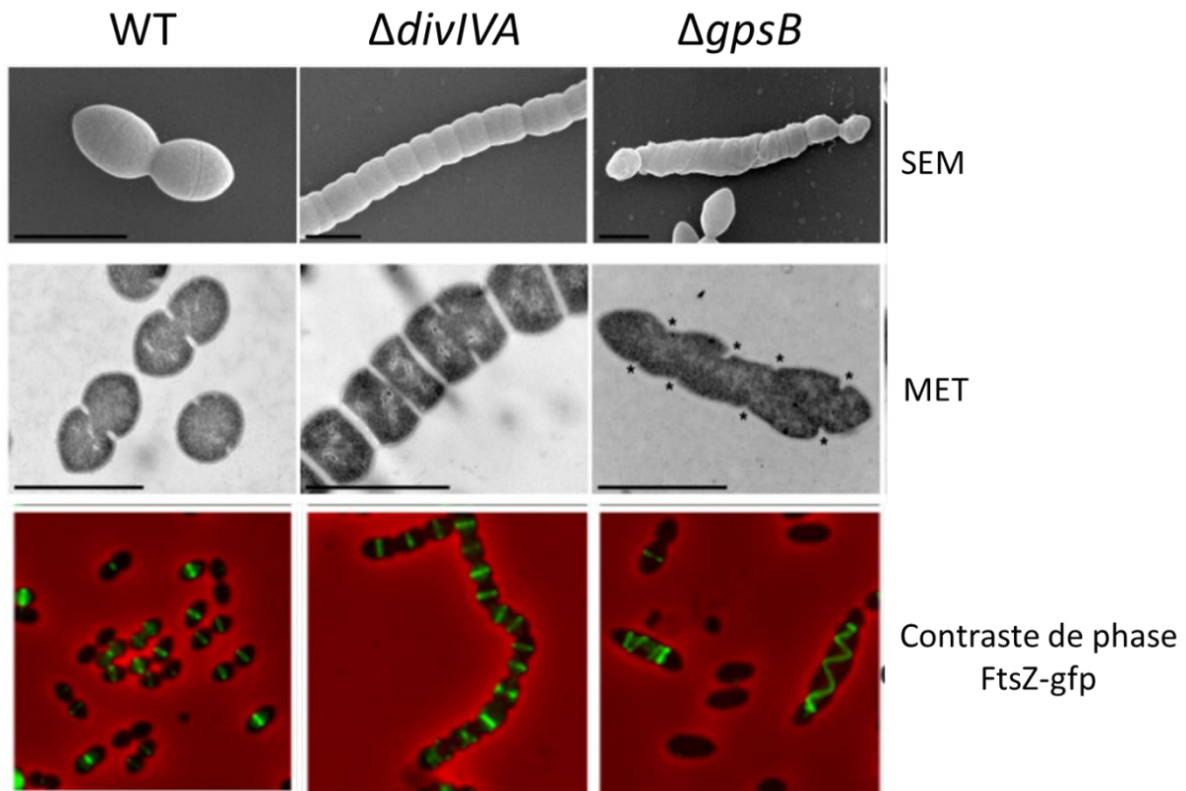
**Figure 32 : Schéma de la composition des deux machineries de synthèse du peptidoglycane.** La machinerie de synthèse longitudinale qui permet l'élargissement cellulaire est composée de Pbp2b, RodA, MreC, MreD, MltG, CozEa/b et d'EloR. La machinerie de synthèse septale comporte Pbp2x, FtsW, FtsL, DivIB et DivIC. Pbp1a, GpsB et DivIVA sont présentes dans les deux machineries de synthèse avec EzrA qui les connecte à FtsZ. Adapté de (Sham et al., 2012).

Certaines protéines sont retrouvées dans les deux machineries de synthèse du peptidoglycane. C'est notamment le cas de Pbp1a, dont la « navette » entre les sites d'élargissement et de division serait assurée par EzrA et GpsB, comme il l'a été décrit chez *B. subtilis* (Claessen et al., 2008). GpsB a été montrée comme interagissant avec différents composants des deux machineries chez le pneumocoque : MreC, Pbp1a et Pbp2x, ainsi que Pbp2b indirectement (Cleverley et al., 2019). De plus, en absence de *gpsB*, le pneumocoque montre des cellules allongées avec de multiples anneaux, ce qui suggère un rôle dans la synthèse septale (Fleurie et al., 2014b; Land et al., 2013). L'absence du paralogue de GpsB, DivIVA, génère des chaînes constituées de petites cellules indiquant plutôt un rôle dans la synthèse périphérique.

Comme le pneumocoque ne possède pas la protéine MreB qui coordonne les deux machineries comme dans les bactéries en forme de bâtonnet comme *E. coli*, il est proposé que FtsZ assure ce rôle *via* la protéine EzrA, qui interagit avec GpsB et DivIVA (Fleurie et al., 2014b; Sham et al., 2012).

### 2.2.3.2. Modèle de synthèse à une machinerie

Un autre modèle suggère que le pneumocoque ne possède qu'une seule machinerie de synthèse du peptidoglycane, composée de Pbp2b/RodA et Pbp2x/FtsW. Ce modèle repose sur l'observation des mutants  $\Delta divIVA$  et  $\Delta gpsB$  (Figure 33).

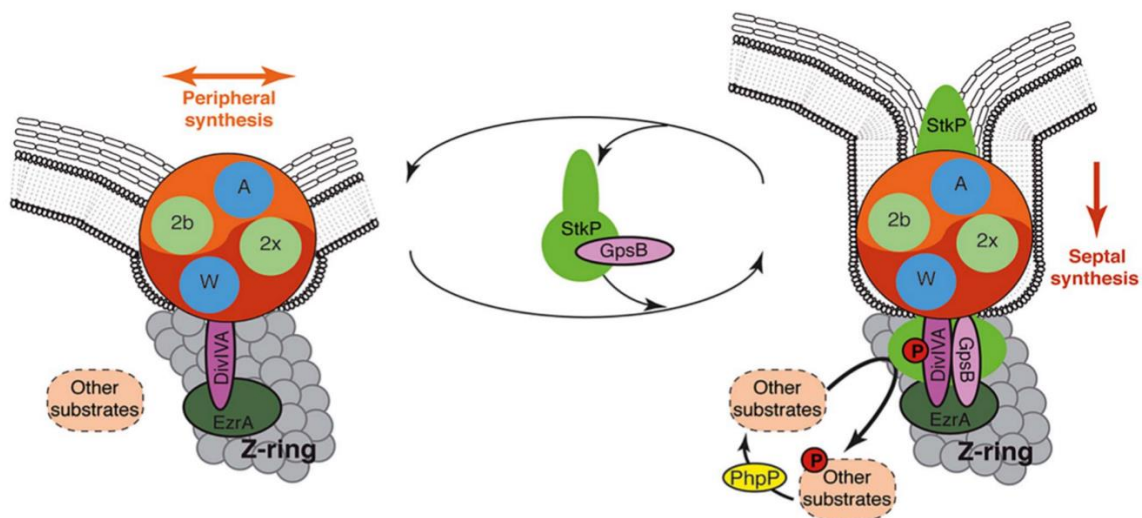


**Figure 33 : Caractéristiques des mutants  $\Delta gpsB$  et  $\Delta divIVA$ .** Images de microscopie électronique à balayage (SEM) et de microscopie électronique à transmission (MET) avec une barre d'échelle de 1  $\mu$ m de la souche sauvage du pneumocoque (WT) et des mutants de délétion de *divIVA* et de *gpsB*. Les étoiles sur les images de MET correspondent à des défauts d'initiations de septation. La troisième ligne correspond à des images de microscopie optique à fluorescence dans des souches de pneumocoque exprimant FtsZ-GFP (signal vert). Adapté de (Fleurie et al., 2014b).

Un mutant  $\Delta divIVA$  montre de longues chaînes de petites cellules, traduisant un rôle de DivIVA dans l'élongation. A l'inverse, en absence de *gpsB*, les cellules sont allongées et non constrictes, ce qui suggère un rôle de GpsB dans la septation. Pbp2x et FtsW, qui contribuent à la septation, sont toujours essentielles dans un mutant  $\Delta gpsB$ . De la même manière, Pbp2b et RodA, qui sont impliquées dans la synthèse périphérique, sont toujours essentielles en absence de *divIVA* (Fleurie et al., 2014b). Ceci indique que, bien que Pbp2b et Pbp2x soient

responsables des synthèses périphérique et septale respectivement, RodA, Pbp2b, FtsW et Pbp2x sont nécessaires pour les deux types de synthèse. De plus, Pbp2b/RodA et Pbp2x/FtsW co-localisent avec FtsZ et montrent tous un profil hélicoïdal similaire à celui de FtsZ dans des cellules  $\Delta gpsB$  (Figure 33) (Fleurie et al., 2014b). Ces données supportent qu'un seul complexe est en charge de la synthèse de la paroi, coordonné par FtsZ pour maintenir la forme ovoïde du pneumocoque.

Il a donc été proposé qu'il n'existerait qu'une seule machinerie de synthèse de la paroi chez le pneumocoque, coordonnée par FtsZ et régulée par la triade DivIVA/GpsB/StkP. Il a été démontré que DivIVA est phosphorylée par StkP, et que cette forme favorise la synthèse septale, alors que la forme non phosphorylée de DivIVA promeut l'élongation cellulaire. GpsB est requise pour la localisation de StkP au site de division et pour son activité kinase (Fleurie et al., 2014b). Ainsi, GpsB favoriserait la synthèse septale et agirait comme un régulateur négatif de DivIVA pour limiter la synthèse périphérique (Figure 34).



**Figure 34 : Modèle de la coordination des synthèses périphérique et septale chez le pneumocoque.**

A. Régulation des machineries de synthèse par la triade DivIVA/GpsB/StkP. La machinerie de synthèse périphérique est représentée en orange avec Pbp2b (cercle vert 2b) et RodA (cercle bleu A) alors que la machinerie de synthèse septale est représentée en rouge avec Pbp2x (cercle vert 2x) et FtsW (cercle bleu W). Les deux machineries sont connectées à l'anneau Z par EzrA (ovale vert foncé). Le schéma de gauche montre une synthèse périphérique activée, du fait de l'absence de phosphorylation de DivIVA (ovale violet). Le schéma de droite montre une synthèse septale stimulée par la présence de GpsB (ovale rose) qui recrute StkP (ovale vert clair) et ainsi promeut la phosphorylation de DivIVA. StkP est également impliquée dans la phosphorylation d'autres substrats, et régulée négativement par la phosphatase PhpP (ovale jaune). D'après (Fleurie et al., 2014b).

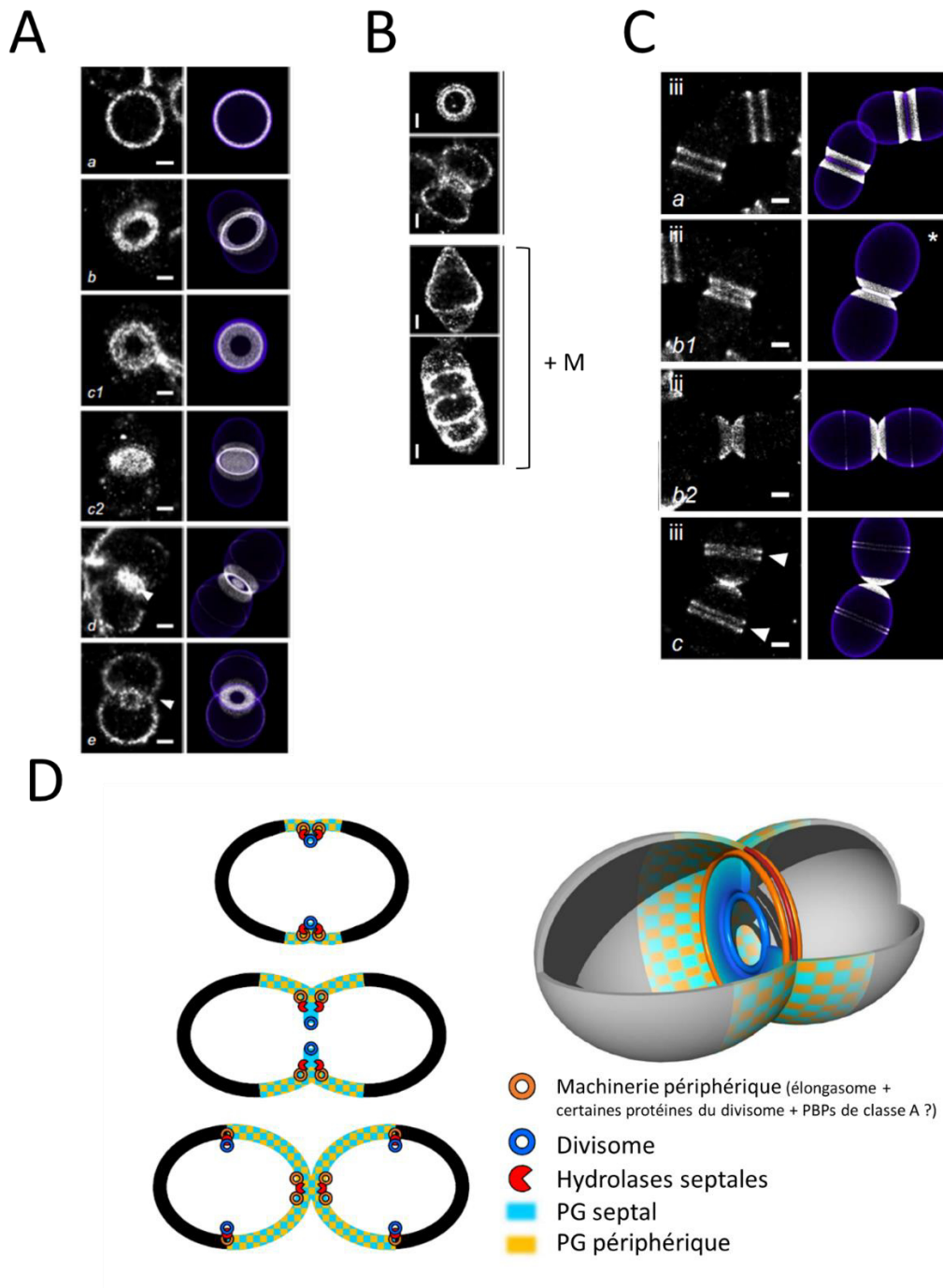
La phosphorylation/déphosphorylation par StkP et sa phosphatase associée PhpP, permet de réguler rapidement et de manière réversible ce système (voir partie III.1.). Les protéines GpsB et DivIVA ne sont cependant pas connectées directement à FtsZ pour coordonner les synthèses septale et périphérique. Il a donc été proposé que EzrA serve d'intermédiaire (Fleurie et al., 2014b).

#### 2.2.3.3. *Modèle de synthèse/remodelage de la paroi*

Un nouveau modèle a émergé récemment, grâce à l'utilisation d'une nouvelle méthode permettant d'étudier l'assemblage du peptidoglycane à l'échelle du nanomètre (Trouve et al., 2021). Cette technique utilise une modification chimique du D-Ala-D-Ala (aDA-DA), ajouté au lipide II par MurF dans le cytoplasme, et incorporé à la paroi préexistante. Le couplage avec un fluorophore permet l'observation du signal par microscopie à super résolution (dSTORM : *direct STOchastic Optical Reconstruction Microscopy*).

L'observation, depuis l'axe longitudinal, du marquage au aDA-DA dans des cellules disposées verticalement montre un anneau concentrique dont l'épaisseur augmente au fur et à mesure que le diamètre extérieur rétrécit, ce qui est caractéristique de la constriction (Figure 35A cellules a et b). Au fur et à mesure de la division cellulaire, deux anneaux apparaissent, traduisant deux sites de synthèse de la paroi (Figure 35A cellules c). L'inactivation spécifique de Pbp2x par la méticilline montre la disparition de l'anneau interne, qui se rapproche au centre de la cellule, assurant donc à la synthèse septale (Figure 35B). La présence dans ce cas de deux anneaux distincts suggère des dynamiques différentes des synthèses septale et périphérique, avec une septation se réalisant plus rapidement que la fermeture périphérique du septum par les hydrolases de la paroi. A des étapes plus tardives de la division, les sites équatoriaux sont également marqués (Figure 35B).

Des expériences de « pulse-chase », d'incorporation de aDA-DA, montrent l'évolution du marquage de peptidoglycane en fonction du cycle cellulaire. Deux bandes sont observées dans les cellules naissantes et légèrement constrictes ; l'absence de marquage entre les deux provient de la synthèse septale (Figure 35C cellules a et c). Les régions « chassées » sont plus larges que les bandes marquées lors du pulse, suggérant un remodelage du peptidoglycane



**Figure 35 : Modèle de synthèse/remodelage de la paroi.** A. Observation en dSTORM dans l'axe vertical, des cellules de pneumocoque marquées au aDA-DA. Les données de microscopies sont présentes dans le panel de gauche, et la localisation déterminée par le modèle mathématique à droite. Les barres d'échelle correspondent à 250 nm. B. Observation en dSTORM dans l'axe vertical, des cellules de pneumocoque marquées au aDA-DA en présence de Méthicilline (+ M) C. Observation en dSTORM dans l'axe vertical, des cellules de pneumocoque marquées au aDA-DA puis chassées sans marquage. D. Modèle de l'assemblage et du remodelage de la paroi chez le pneumocoque. Les machineries sont représentées par des anneaux orange et bleus pour l'élongasome et le divisome respectivement. De la même manière, le peptidoglycane périphérique est présenté en orange, alors que le peptidoglycane septal l'est en bleu. Les hydrolases sont montrées en rouge. Adapté de (Trouve et al., 2021).

septal. De plus, ces deux bandes augmentent en largeur au fur et à mesure que la constriction se réalise.

Ces résultats sont en faveur d'un modèle de la synthèse du peptidoglycane selon lequel le peptidoglycane septal est synthétisé tout au long du cycle cellulaire et continuellement traité par des hydrolases pour devenir latéral. Au sein de ce peptidoglycane latéral, du peptidoglycane issu de la synthèse périphérique serait inséré, générant une paroi mixte produite par conséquent à la fois par la machine septale et la machine périphérique (Figure 35D). Le peptidoglycane d'origine périphérique proviendrait de l'élongasome, mais également probablement des protéines du divisome et des PBPs de classe A localisées à la périphérie du septum. Au fur et à mesure que le cycle progresse, la division assurée par les hydrolases et la synthèse périphérique seraient de plus en plus retardées par rapport à la synthèse septale, ce qui permettrait la formation du septum. A la fin du cycle cellulaire, le septum est fermé mais continue d'être remodelé jusqu'à séparation des cellules filles.

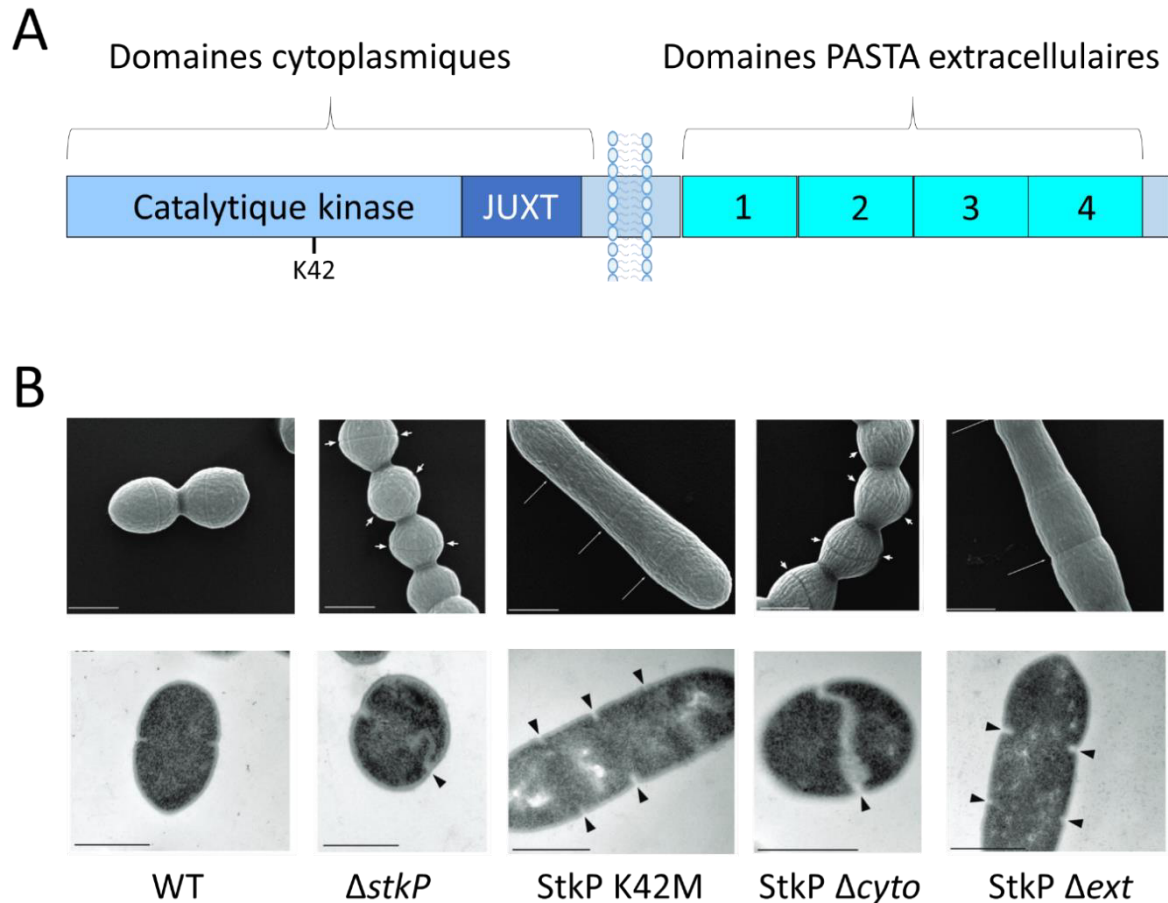
### III. La régulation du cycle cellulaire de *S. pneumoniae* par la phosphorylation

Le pneumocoque est un modèle très utilisé pour étudier la phosphorylation des protéines sur les Sérine/Thréonine/Tyrosine. En effet, le pneumocoque ne compte qu'une STPK et qu'une BYK : StkP et CpsD respectivement. StkP est un régulateur important de la division cellulaire et de la morphogénèse, alors que CpsD est impliquée dans la synthèse et le transport de polysaccharides extracellulaires. CpsD contribue également à la coordination entre la synthèse de la capsule et la ségrégation des chromosomes au cours du cycle cellulaire. Je détaille dans cette partie les connaissances sur ces deux protéine-kinases.

#### 1. StkP

##### 1.1. Caractéristiques structurales de StkP

StkP est une protéine membranaire de la famille des STPK comme défini par Hanks avec un domaine catalytique kinase cytoplasmique (Figure 5 partie I.3.1) et quatre domaines PASTA extracellulaires (Figure 36A).



**Figure 36 : StkP de *S. pneumoniae*.** A. Représentation schématique des domaines de StkP. StkP est composée d'une partie cytoplasmique avec un domaine catalytique (rectangle bleu) dont l'activité kinase dépend de la Lysine catalytique K42, et un domaine juxtamembranaire JUXT (rectangle bleu foncé). Le domaine extracellulaire est composé de quatre domaines PASTA (rectangles bleu turquoise), et est relié au domaine cytoplasmique par un segment transmembranaire. B. Images de microscopie électronique à balayage (fond noir) et à transmission (fond clair) de mutants de StkP. En absence de StkP ( $\Delta$ *stkP*) ou de son domaine cytoplasmique ( $\Delta$ *cyto*), les cellules sont arrondies et forment des chaînes. Les mutants catalytique (K42M) et de délétion des domaines PASTA ( $\Delta$ *ext*) montrent des cellules allongées. Les multiples septa, qui traduisent un mauvais positionnement de la machinerie de synthèse de la paroi, sont pointés par des flèches blanches et noires. Barres d'échelles de 0.5  $\mu$ m. Adapté de (Fleurie et al., 2012; Manuse et al., 2015).

Un mutant catalytique de StkP (StkP K42M), dans lequel la Lysine du sous-domaine 2 de Hanks est mutée, est incapable de s'autophosphoryler et de phosphoryler ses cibles. L'expression de StkP K42M par le pneumocoque induit un phénotype de cellules allongées



avec de multiples septa non fonctionnels (Figure 36B) (Fleurie et al., 2012). L'activité kinase de StkP est donc nécessaire à la division cellulaire, et notamment à l'assemblage et/ou la fermeture du septum. Cependant, des mutants dépourvus de StkP ( $\Delta stkP$ ) ou de son domaine cytoplasmique (StkP  $\Delta cyto$ ) montrent un phénotype différent avec des cellules en chaîne et arrondies (Fleurie et al., 2012). Ces résultats suggèrent que le rôle de StkP dans la division cellulaire n'est pas limité à sa capacité de phosphorylation de ses cibles.

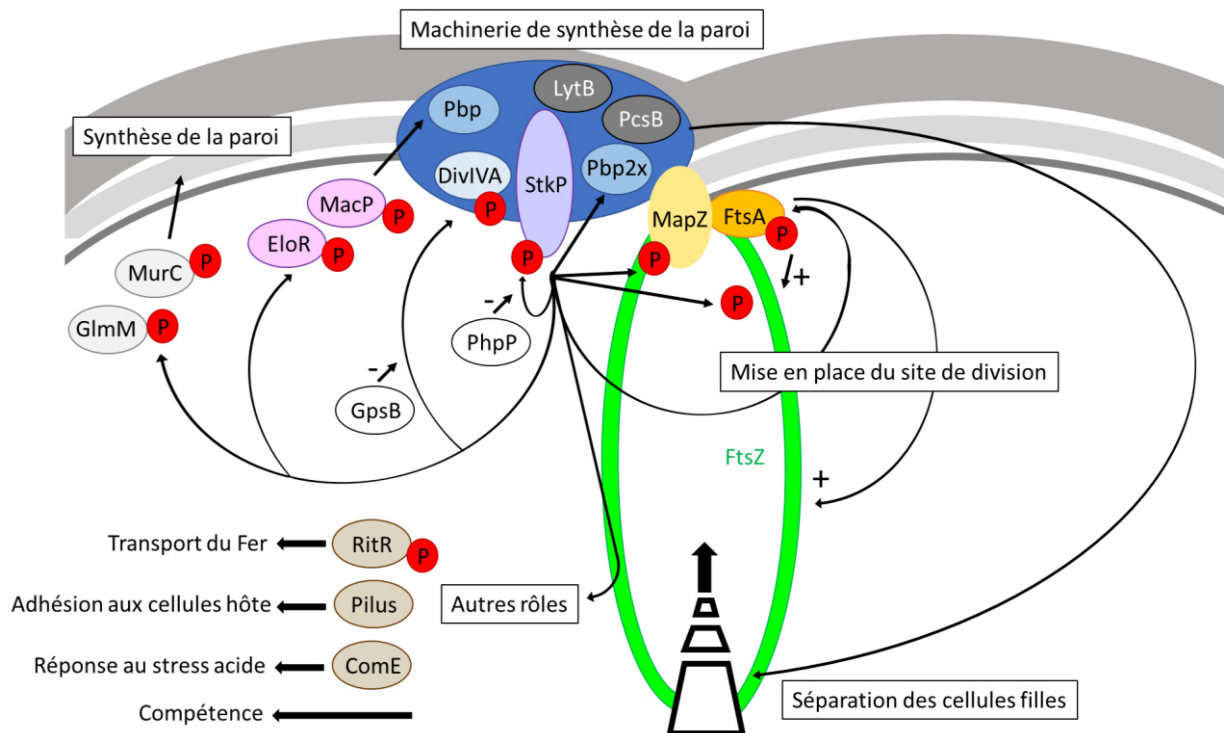
Par ailleurs, la délétion du domaine extracellulaire de StkP (StkP  $\Delta ext$ ) montre un phénotype de cellules allongées présentant de multiples septa, similaire à un mutant catalytique de StkP (StkP K42M) (Figure 36B) (Fleurie et al., 2012). Ceci suggère que le domaine extracellulaire de StkP contrôle l'activité kinase de StkP. Des hypothèses basées sur le fonctionnement des protéine-kinases récepteurs eucaryotes suggèrent que les PASTA-STPK pourraient transduire des signaux provenant de l'extérieur, grâce à leur domaine extracellulaire (Pereira et al., 2011). Une étude récente a permis de confirmer que les domaines PASTA123 chez le pneumocoque sont nécessaires à l'activation de StkP, indépendamment de leur liaison au peptidoglycane. Le rôle des domaines PASTA apparaît donc plus complexe que celui d'un unique « senseur » de signaux extracellulaires pour induire une réponse adaptée.

Le domaine PASTA4 est à la fois nécessaire à la localisation septale de StkP et à l'interaction avec l'hydrolase LytB pour assurer la séparation finale des cellules filles. Cependant, ce rôle du PASTA4 semble spécifique aux bactéries du genre streptocoques, ce qui suggère d'autres fonctions au sein d'autres genres et espèces bactériens (Manuse et al., 2015). Par exemple, le domaine PASTA distal de PknB de *M. tuberculosis* est requis pour la division cellulaire et sa localisation cellulaire au septum et aux pôles, alors que l'interaction de celui de PrkC de *B. subtilis* avec le peptidoglycane stimule la germination des spores (Mukamolova et al., 2015).

## 1.2. Les rôles de StkP dans la division cellulaire

StkP joue un rôle majeur dans la division cellulaire pour la localisation spatiale des sites de synthèse de la paroi, l'assemblage et la fermeture du septum lors de la séparation des

cellules, et agit à travers de nombreux substrats et partenaires (Figure 37) (Beilharz et al., 2012; Fleurie et al., 2012).



**Figure 37 : Rôle de StkP chez *S. pneumoniae*.** StkP est localisée au septum, s'autophosphoryle et est déphosphorylée par PhpP. Elle est impliquée dans de nombreux rôles comme la mise en place du site de division en phosphorylant MapZ (ovale jaune), qui recrute FtsZ pour former l'anneau Z (en vert) sous contrôle de ses régulateurs positifs FtsA et EzrA (ovales oranges), pouvant également être phosphorylées par StkP, tout comme FtsZ. StkP joue également le rôle de coordinateur de la machinerie de synthèse de la paroi périphérique et septale avec GpsB et DivIVA qu'elle phosphoryle (ovale bleu clair). StkP régule de nombreuses protéines de la machinerie de synthèse du peptidoglycane : elle est nécessaire à la localisation de Pbp2x et régule les PBP en phosphorylant leurs régulateurs MacP et EloR (ovales rose). Elle module également l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse de la paroi comme MurC et GlmM (ovales gris), et gouverne la séparation des cellules filles en régulant l'expression des hydrolases du peptidoglycane LytB et PcsB (ovales noirs). StkP est impliquée dans d'autres rôles physiologiques comme le transport du fer *via* RitR, l'expression du pilus pour l'adhésion aux cellules hôtes, la réponse au stress acide médiée par ComE mais aussi la compétence. Adapté de (Grangeasse, 2016).

StkP phosphoryle de nombreuses protéines impliquées dans la division cellulaire et la synthèse du peptidoglycane.

Des expériences *in vitro* ont montré que StkP est capable de phosphoryler, FtsZ qui constitue l'anneau Z, MurC et GlmM, enzymes impliquées dans la synthèse du précurseur

lipide II dans le cytoplasme (Figure 37) (voir partie II.2.1.2.) (Falk & Weisblum, 2013; Giefing et al., 2010; Nováková et al., 2005). De plus, des études de phosphoprotéomiques ont révélé des substrats potentiels de StkP comme la protéine FtsA qui ancre FtsZ à la membrane, et l'hydrolase du peptidoglycane MltG (Stülke et al., 2020; Sun et al., 2010). Ces interactions doivent cependant être confirmées *in vitro* et *in vivo*.

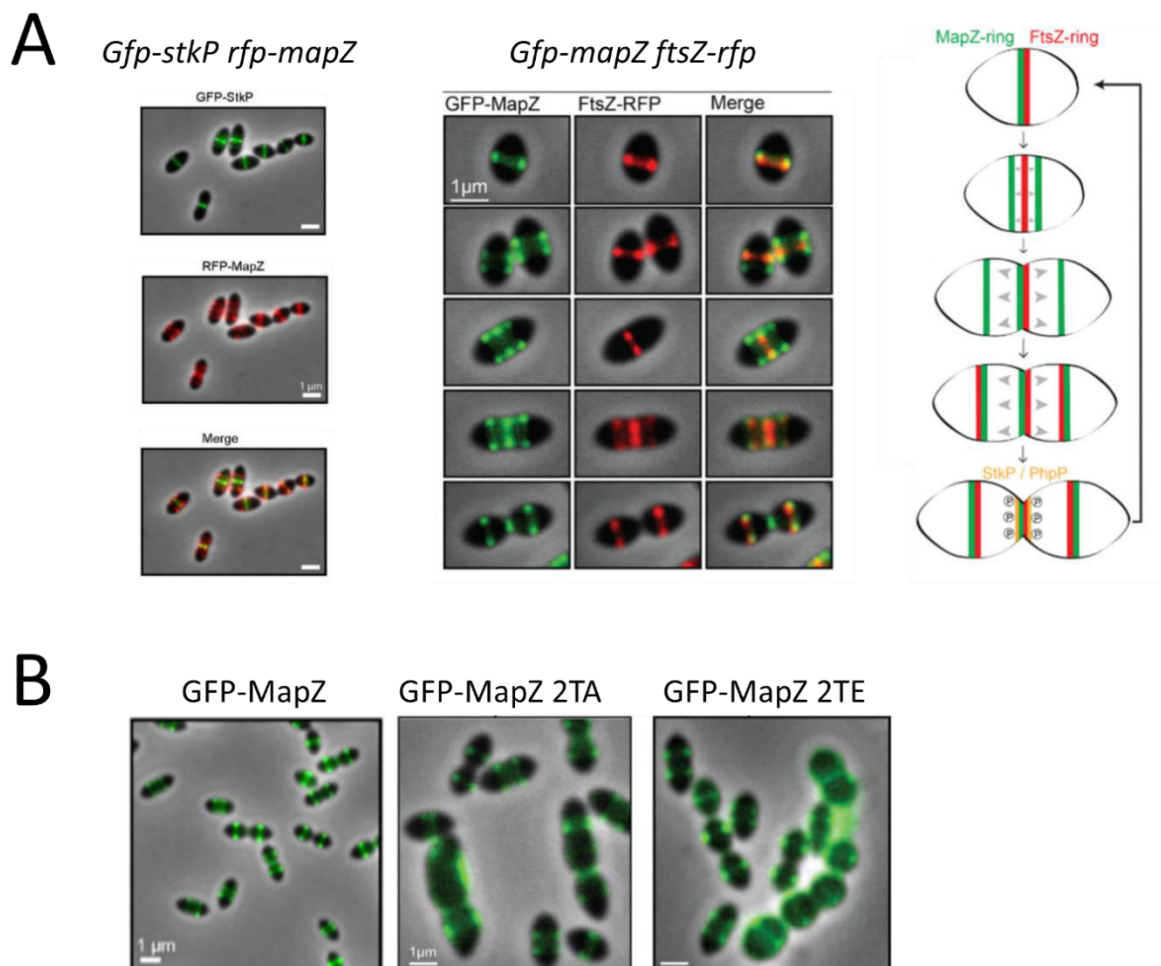
Par ailleurs, il a été montré que StkP possède des substrats *in vivo*.

EloR (ou KhpB, ou Jag) est une protéine cytoplasmique impliquée dans la synthèse périphérique. Elle est phosphorylée par StkP, ce qui stimule l'élongation cellulaire. Un excès de phosphorylation n'est cependant pas toléré puisque les cellules s'allongent. De plus, les cellules possédant une forme d'EloR phosphomimétique accumulent des mutations dans les gènes des protéines de l'élongasome MreC et RodZ (Stamsås et al., 2017). Par ailleurs, l'absence d'EloR réduit l'activité de MltG, et rend Pbp2b et RodA dispensables chez le pneumocoque (Stamsås et al., 2017; Zheng et al., 2017). Il a été proposé que l'hydrolase MltG participerait au recrutement du complexe EloR/KhpA pour réguler l'élongation cellulaire avec StkP (Winther et al., 2020). StkP supervise donc l'activité de l'élongasome (Figure 37).

StkP régule également l'activité de Pbp2a par phosphorylation de MacP, une protéine ancrée à la membrane et activatrice de Pbp2a (Figure 37) (voir partie II.2.1.4.)). L'inactivation de la phosphorylation de MacP par StkP empêche l'activité de Pbp2a sans pour autant affecter leur interaction (Fenton et al., 2018). Leur mode d'action reste encore à déterminer mais il est possible que MacP agisse avec DivIVA pour promouvoir le changement entre les modes de synthèse périphérique et septale du peptidoglycane, et/ou que GpsB recrute StkP *via* son interaction avec Pbp2a pour stimuler la phosphorylation des substrats de StkP, notamment MacP.

Un autre substrat de StkP est la protéine DivIVA, impliquée dans l'élongation cellulaire et la formation des pôles chez le pneumocoque (Figure 37). En effet, l'abolition de la phosphorylation de DivIVA conduit à des cellules allongées avec des renflements polaires (Fleurie et al., 2012). La phosphorylation de DivIVA favorise la synthèse septale, alors que sa forme non phosphorylée stimule l'élongation cellulaire. L'état de phosphorylation de DivIVA est contrôlé par GpsB, qui permet stimule l'activité kinase de StkP pour phosphoryler ses cibles. Ainsi la triade DivIVA/GpsB/StkP coordonne les synthèses périphérique et septale chez le pneumocoque (voir Figure 35 partie II.3.3.2.) (Fleurie et al., 2014b).

StkP phosphoryle également MapZ, la protéine d'identification du site de division qui recrute FtsZ pour la mise en place du divisome (Figure 37) (Fleurie, et al., 2014a). La temporalité d'assemblage des intervenants au site de division, au niveau duquel arrivent d'abord MapZ, puis FtsZ et enfin StkP, est cohérente avec le fait que la phosphorylation de MapZ n'influence pas le positionnement de FtsZ (Figure 38A) (Beilharz et al., 2012).



**Figure 38 : Localisation de MapZ chez le pneumocoque.** A. Microscopie à contraste de phase et à fluorescence de *gfp-stkP rfp-mapZ* dans le panel 1 avec StkP en vert, MapZ en rouge et leur superposition en jaune. De la même manière dans le panel 2, MapZ fluoresce en vert et FtsZ en rouge dans la souche *gfp-mapZ ftsZ-rfp*. Les barres d'échelles correspondent à 1 μm. Le panel 3 est un modèle de la localisation de MapZ (en vert), de FtsZ (en rouge) et de StkP ainsi que sa phosphatase Php (en orange) au cours de la division cellulaire. B. Microscopie à contraste de phase et à fluorescence de GFP-MapZ WT, phosphablatif (2TA) et phosphomimétique (2TE). Les barres d'échelles correspondent à 1 μm. Adapté de (Fleurie et al., 2014a).

Il a été montré que la phosphorylation de MapZ n'interfère pas avec la structure et la liaison de MapZ à FtsZ, ainsi qu'aux lipides membranaires, et n'influence donc pas la localisation de FtsZ, ni sa polymérisation. Cependant, les mutants phosphoablatif et phosphomimétique de

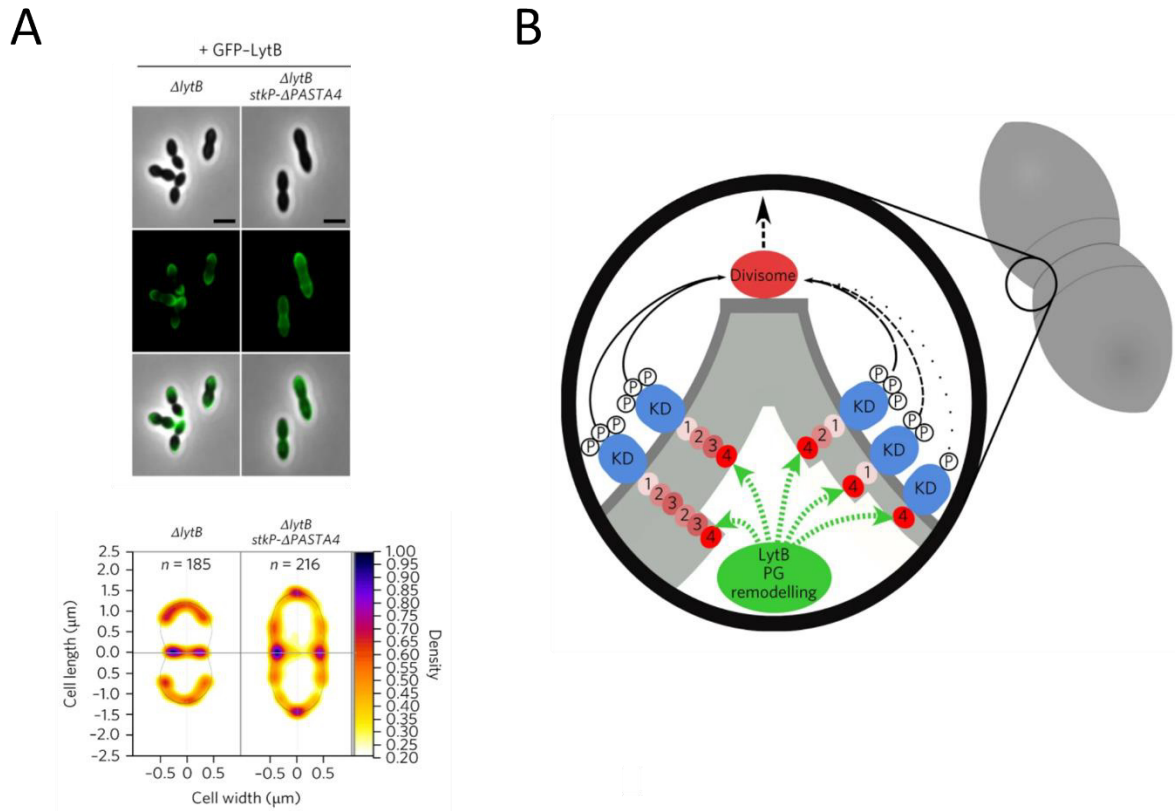
MapZ (MapZ 2TA et 2TE respectivement) montrent des défauts de forme et de viabilité, mais aussi des structures aberrantes de FtsZ, des diamètres de l'anneau Z altérés et un nombre réduit d'anneaux Z par cellule (Figure 38B) (Fleurie et al., 2014a). Le rapport entre les formes phosphorylées et non phosphorylées impacterait donc la dynamique de FtsZ et jouerait un rôle sur la constriction cellulaire, probablement *via* une interaction avec d'autres partenaires qu'il reste à identifier (Fleurie et al., 2014a; Hosek et al., 2020).

Au-delà de son rôle de phosphorylation, StkP interagit avec différentes protéines pour jouer un rôle de chef d'orchestre.

Il a été démontré que GpsB interagit avec le domaine cytoplasmique kinase de StkP (Figure 37). Cette interaction est cruciale pour la localisation de StkP au site de division et sa capacité à phosphoryler ses cibles (Fleurie et al., 2014b).

StkP module l'activité des PBPs, qui polymérisent le peptidoglycane. StkP et Pbp2x interagissent au niveau de leur domaines extracellulaires composés de domaines PASTA (Figure 37) (voir partie I.3.1.2.). Ce sont notamment les domaines PASTA123 de StkP qui participent au recrutement de Pbp2x au septum de division, sans toutefois phosphoryler Pbp2x, afin de constituer une machinerie de division fonctionnelle (Morlot et al., 2013; Zucchini et al., 2017).

Dans le but d'assurer la constriction, StkP module également l'expression des hydrolases du peptidoglycane PscB et LytB (Figure 37) (Bai et al., 2014; Bartual et al., 2014). Un mutant dépourvu de StkP voit l'expression de ces deux protéines diminuée (Sasková et al., 2007). Par ailleurs, l'absence du domaine PASTA4 de StkP montre un phénotype de cellules organisées en chaînes de manière similaire à un  $\Delta$ lytB, suggérant que le rôle de LytB est compromis en absence du PASTA4 de StkP (Zucchini et al., 2017). Il a été démontré que LytB et StkP interagissent, et plus particulièrement *via* le domaine PASTA4 de StkP. L'absence du domaine PASTA4 conduit à la délocalisation de LytB à la périphérie cellulaire (Figure 39A). Le domaine PASTA4 de StkP est donc nécessaire à la localisation de LytB au septum de division, pour que LytB assure son rôle dans la séparation finale des cellules filles (Figure 39B). Par ailleurs, il a été proposé que les domaines PASTA123 positionnent correctement le domaine PASTA4 dans le peptidoglycane pour en contrôler l'épaisseur, permettre l'action de l'hydrolase LytB, et activer StkP qui régule par phosphorylation plusieurs protéines de la division cellulaire (Figure 39B et 37) (Zucchini et al., 2017).



**Figure 39 : Le PASTA4 de StkP localise LytB au site de division.** A. Localisation de GFP-LytB dans les mutants StkP. Microscopie optique à contraste de phase et à fluorescence de GFP-LytB ajoutée de manière exogène sur les cellules de pneumocoque mutés pour StkP et les cartes de chaleur correspondantes. B. Modèle de la coordination par StkP de la constriction avec l'hydrolyse septale de la paroi. Les domaines PASTA de StkP sont représentés par des ronds avec les numéros 1 à 4 correspondant aux PASTA 1 à 4, l'ovale KD correspond au domaine catalytique de StkP autphosphorylé (ovales P). La répétition de PASTA est nécessaire à l'activation de StkP et pour la régulation des protéines de la division (ovale rouge « divisome ») par phosphorylation (ovale P) par StkP. La localisation du domaine PASTA4, conditionne l'épaisseur de la paroi et contrôle la séparation finale des deux cellules filles par LytB (ovale vert). Adapté de (Zucchini et al., 2017).

StkP est impliquée dans de nombreux autres rôles chez le pneumocoque (Figure 37). Notamment, sa compétition d'interaction avec la phosphatase PhpP vis-à-vis de RitR, le régulateur de réponse orphelin, participe à l'absorption du fer (Ulijasz et al., 2009). StkP régule aussi l'expression du pilus et module ainsi l'adhérence aux cellules eucaryotes (Herbert et al., 2015). L'absence de StkP conduit à la fois à la diminution de l'expression des gènes tardifs de compétence et à une insensibilité au CSP, résultant en une diminution du taux de transformation (Sasková et al., 2007). De plus, l'expression des gènes précoces de la compétence inhibe la phosphorylation des substrats de StkP dont DivIVA, ce qui suggère un lien étroit entre la compétence et la division cellulaire (Bergé et al., 2017; Fleurie et al., 2014b).

De manière intéressante, il existe une communication croisée entre les différents systèmes de phosphorylation. Par exemple, StkP est capable de phosphoryler le régulateur de réponse de la compétence ComE sur la Thréonine 128, et de l'activer en conditions acides. Cette phosphorylation est indépendante de ComD, qui phosphoryle l'Aspartate 58 de ComE pour activer la compétence. ComE phosphorylée stimule ainsi la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par SpxB et SodA, et déclenche l'autolyse médiée par LytA pour relâcher des facteurs de virulence, endommageant ainsi les cellules hôtes en conditions d'infection (Piñas et al., 2018).

StkP semble orchestrer de nombreux réseaux dont on ne connaît pas encore l'ensemble des fonctions (Figure 37).

### 1.3. La phosphatase PhpP

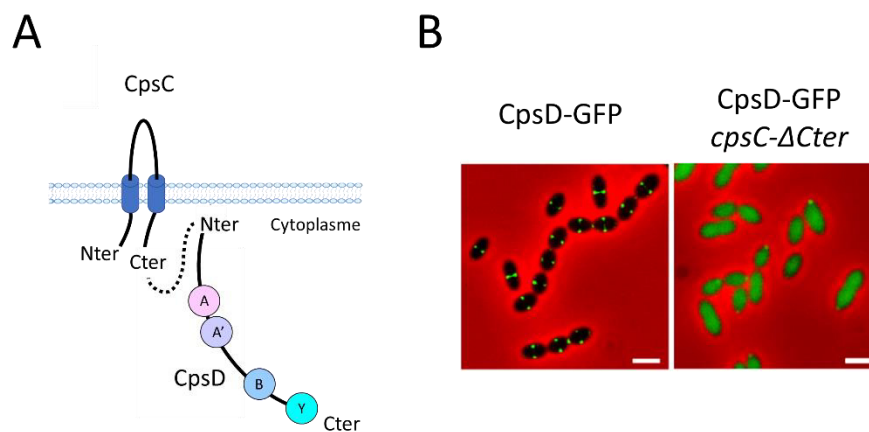
*stkP* est co-transcrit avec *phpP*, codant pour la phosphatase PhpP. PhpP appartient à la famille des PPM dépendante du Mn<sup>2+</sup> et est localisée au septum de manière dépendante de StkP (Beilharz et al., 2012; Nováková et al., 2005). PhpP déphosphoryle de nombreux substrats de StkP, comme DivIVA, GpsB, MreC, MacP, MltG et EloR et module ainsi finement les niveaux de phosphorylation liés à StkP dans la cellule. PhpP et StkP jouent aussi un rôle dans la compétence en agissant sur les TCS ComDE et CiaRH, mais également dans la réponse au choc thermique et au stress oxydatif (Ulrych et al., 2016). L'absence de *phpP* chez le pneumocoque augmente l'abondance des protéines impliquées dans l'import du phosphate *via* Pst, ce qui suggère que le rôle de PhpP puisse aller au-delà de l'unique déphosphorylation des substrats de StkP (Stülke et al., 2020).

## 2. CpsD

### 2.1. Organisation structurale de CpsD

Les BYK sont connues pour fonctionner avec leur activateur membranaire chez les Firmicutes (voir partie I.4.1). La protéine-kinase CpsD interagit donc avec le domaine C-terminal cytoplasmique de CpsC (Figure 40A). En absence de *cpsC*, CpsD est incapable de s'autophosphoryler et de localiser correctement au site de division (Figure 40B) (Nourikyan et

al., 2015). Les structures des BYK connues rendent probable le fait que CpsD constitue un octamère en forme d'anneau et que son activation par CpsC conduit à la phosphorylation de CpsD, qui se dissocierait alors en monomères afin de phosphoryler ses substrats (Bechet et al., 2010; Olivares-Illana et al., 2008). La déphosphorylation de CpsD est assurée par la phosphatase CpsB. Le cycle de phosphorylation/déphosphorylation, et donc l'alternance de conformations monomère/octamère, agirait comme un interrupteur cellulaire pour la production de la capsule polysaccharidique.



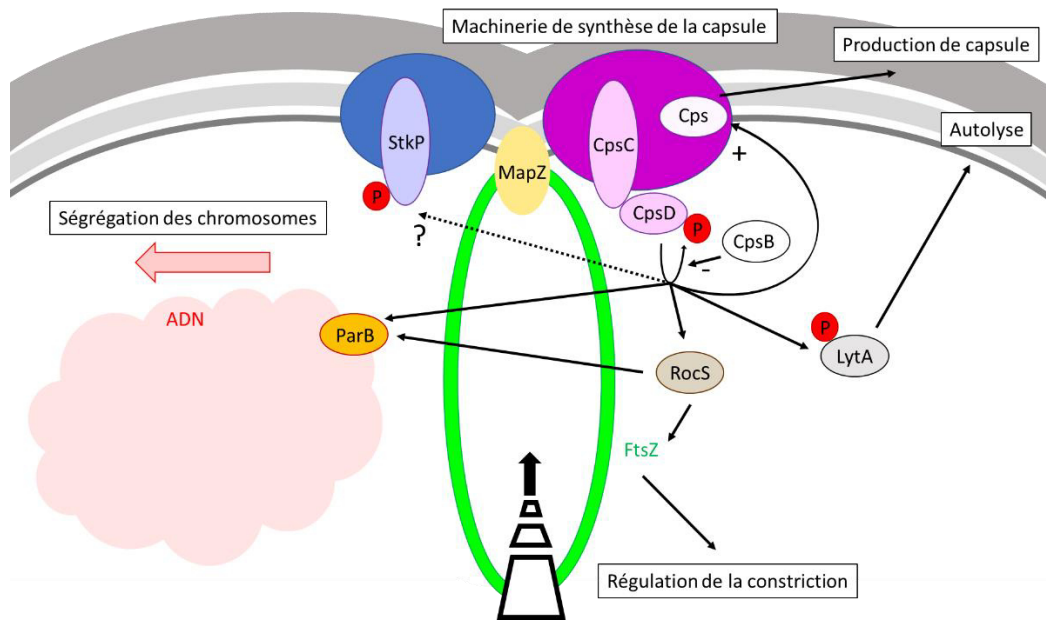
**Figure 40 : Structure et fonction de la BYK CpsCD.** A. Organisation structurale hypothétique de CpsCD. Les BYK chez les firmicutes sont composées de la partie kinase cytoplasmique (CpsD) comprenant les domaines Walker A, A', B et la séquence riche en Tyrosines « Y » et de l'activateur transmembranaire (CpsC). CpsC et CpsD s'associent pour reconstituer une BYK fonctionnelle. B. Localisation de CpsD-GFP par microscopie à contraste de phase et à fluorescence. La barre d'échelle correspond à 2  $\mu$ m. Adapté de (Nourikyan et al., 2015; Whittall et al., 2015).

## 2.2. Rôles biologiques de CpsD

### 2.2.1. Biosynthèse de la capsule

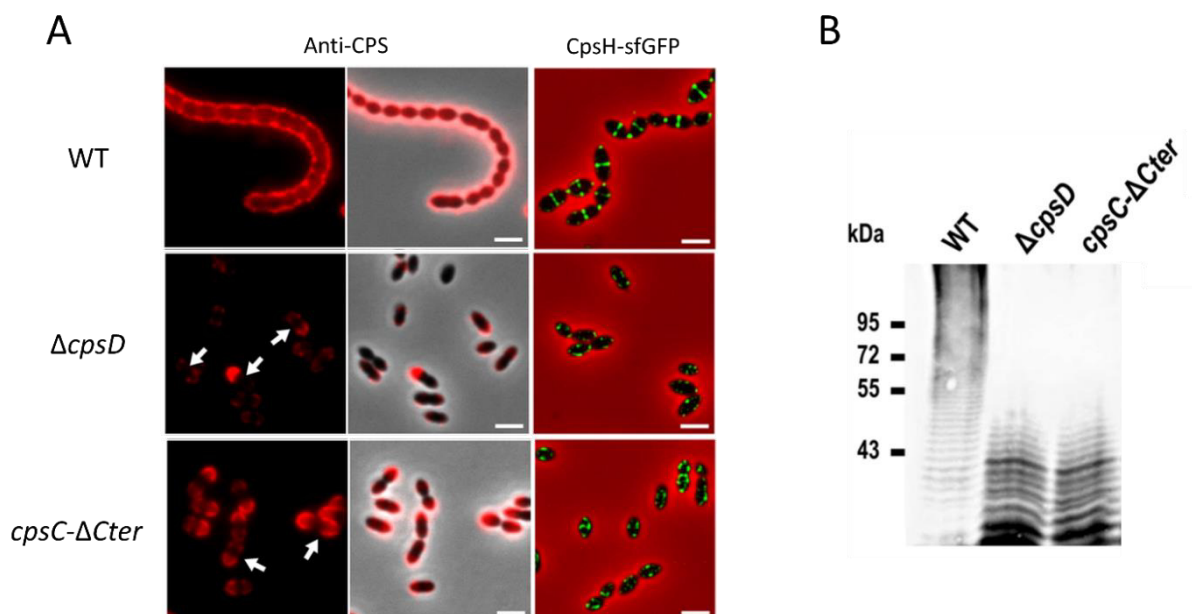
Chez le pneumocoque, *cpsD* est présent dans un large opéron, appelé *cps*, codant les gènes de la biosynthèse et de l'export de la capsule polysaccharidique (CPS) (Figure 16A). La synthèse du CPS implique CpsCD et sa phosphatase CpsB (Yother, 2011). Elle a lieu au septum de division, où se trouvent les protéines constituant la machinerie de synthèse du CPS, dont CpsD et CpsH (Figure 42A).





**Figure 41 : Rôle de CpsD chez *S. pneumoniae*.** La BY-kinase CpsD est fonctionnelle grâce à son association avec son activateur membranaire CpsC (ovales rose). CpsC et D appartiennent à la machinerie de biosynthèse de la paroi (ovale rose foncé). La déphosphorylation de CpsD est réalisée par la phosphatase CpsB. L'autophosphorylation de CpsD (ovale rose clair) impacte la production et l'export de la capsule. CpsD coordonne la biosynthèse de la capsule et la division cellulaire en s'assurant de la correcte ségrégation des chromosomes en agissant sur ParB directement (ovale orange) ou *via* RocS (ovale marron). RocS interagit avec FtsZ (en vert) afin de moduler la constriction cellulaire pour protéger le nucléoïde. CpsD phosphoryle LytA et impacte l'autolyse des cellules. Adapté de (Grangeasse, 2016; Mercy et al., 2019).

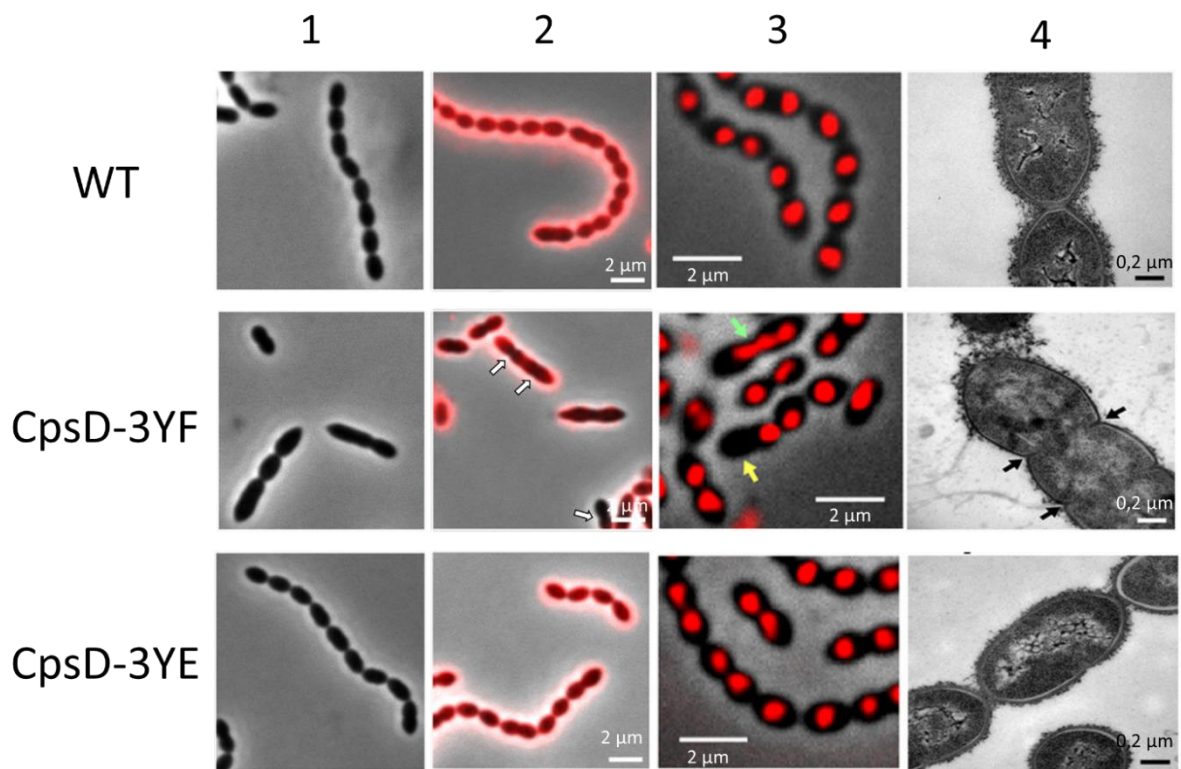
L'absence de *cpsD* ou du domaine C-terminal cytoplasmique de CpsC génère une délocalisation de la synthèse du CPS aux pôles cellulaires et une polymérisation associée à une accumulation des polysaccharides de faible masse moléculaire (Figure 42). Ces défauts s'expliquent par une délocalisation de la polymérase de la biogénèse de la capsule CpsH dans ces deux mutants lorsque la BYK CpsD est inactive (Henriques et al., 2011; Nourikyan et al., 2015). Les mécanismes de régulation de la machinerie de biosynthèse de la CPS par CpsD sont encore mal connus, mais les changements conformationnels induits par les cycles de phosphorylation/déphosphorylation de CpsD pourraient être transmis à CpsC afin de moduler ses interactions avec les protéines de la machinerie de biosynthèse de la CPS. CpsD contribue ainsi à la virulence du pneumocoque en modulant la production de sa capsule. CpsD serait aussi capable de phosphoryler l'hydrolase LytA et ainsi stimuler son activité lytique, résultant en une autolyse prématurée (Figure 41) (Standish et al., 2014). Le rôle de CpsD apparaît complexe et pourrait connecter la synthèse de la capsule à la régulation de la lyse médiée par LytA.



**Figure 42 : Biosynthèse du CPS chez *S. pneumoniae* par CpsCD.** A. Microscopie à contraste de phase et à fluorescence des mutants  $\Delta cpsD$  et *cpsC-ΔCter*. La capsule (CPS) du pneumocoque est visualisée avec un anticorps anti-CPS couplé à un marqueur fluorescent rouge. Les flèches montrent des défauts dans la localisation du CPS. B. Immunodétection des polysaccharides composant le CPS des mutants du pneumocoque avec un anticorps anti-CPS. Adapté de (Nourikyan et al., 2015).

### 2.2.2. Coordination de la synthèse de la capsule et la ségrégation du chromosome

L'étude de la phosphorylation de CpsD a permis de mettre en évidence le lien entre la synthèse de la capsule et le cycle cellulaire. Il a été démontré que CpsD interagit avec la protéine de partition des chromosomes ParB, qui fixe les séquences d'ADN *parS* proches de l'origine de réplication, de manière similaire à ParA chez les autres organismes (Nourikyan et al., 2015).



**Figure 43 : Coordination de la synthèse de la capsule avec le cycle cellulaire.** A. Images de microscopie du mutant CpsD-3YF mimant une absence de phosphorylation et CpsD-3YE mimant une phosphorylation permanente. 1 : Microscopie optique à contraste de phase montrant des cellules allongées. 2 : Microscopie à contraste de phase et à fluorescence de la capsule, immunodétectée par des anticorps. Les défauts de production de la capsule sont montrés par des flèches. 3 : Microscopie à contraste de phase et fluorescence de la protéine fonctionnellement homologue aux histones HlpA-RFP marquant les nucléoïdes. La flèche jaune pointe une cellule anucléée alors que la flèche verte montre un nucléoïde allongé. 4 : Microscopie électronique à transmission avec les multiples septums montrés par des flèches noires. Adapté de (Nourikyan et al., 2015).

La phosphorylation de CpsD stimule la dynamique de ParB pour assurer la ségrégation des chromosomes et permettre une production optimale de la capsule tout autour des cellules

(Figure 43 CpsD 3YE). A l'inverse, l'absence de phosphorylation de CpsD altère l'interaction avec ParB, ce qui réduit la mobilité de ParB, et donc retarde la ségrégation des chromosomes.

En effet, un mutant phosphoablatif CpsD 3YF montre des défauts du nucléoïde, qui est non condensé ou absent de certaines cellules, contrairement à un mutant phosphomimétique CpsD 3YE (Figure 43A panel 3) (Nourikyan et al., 2015).

De plus, l'absence de phosphorylation de CpsD conduit à des défauts de localisation de la machinerie de synthèse du CPS (Figure 43A panel 2). Ceci suggère que l'altération de l'interaction de CpsD avec ParB entraîne une mauvaise production de la capsule, uniquement aux pôles cellulaires.

Par ailleurs, le mutant CpsD 3YF présente des cellules allongées avec de multiples septa, suggérant des défauts dans la constriction (Figure 43A panel 1 et 4). La protéine FtsZ responsable de la formation d'un anneau contractile pour séparer les deux cellules filles est correctement localisée dans le mutant CpsD 3YF. Il a donc été proposé que l'altération de la ségrégation des chromosomes entraînerait un défaut dans la constriction cellulaire, responsable du phénotype de cellules allongées (Nourikyan et al., 2015).

De plus, CpsD interagit avec la protéine RocS (*Regulator of chromosome Segregation*), qui conditionne la ségrégation des chromosomes (Figure 41) (Mercy et al., 2019). Le mode d'action de RocS dépend de son interaction avec ParB proche des origines de réplication, de telle manière que RocS et CpsD n'interagissent ensemble au septum que si le nucléoïde est mal ségrégué. La co-localisation de ces protéines et l'état de phosphorylation de CpsD régulent donc la constriction. Cette régulation pourrait passer par l'anneau Z, puisque RocS et FtsZ interagissent directement *in vitro* (Mercy et al., 2019).

La phosphorylation de CpsD module donc la ségrégation des chromosomes et coordonne ainsi le cycle cellulaire avec la machinerie d'assemblage de la capsule au septum de division (Figure 41).



## OBJECTIF DES TRAVAUX

Les protéine-kinases jouent un rôle important dans la transduction des signaux et le contrôle de processus physiologiques chez les bactéries. Chez le pneumocoque, seules deux protéine-kinases ont été identifiées : StkP qui joue un rôle central dans la division cellulaire et le contrôle de la machinerie de synthèse du peptidoglycane, et CpsD, qui est impliquée dans la synthèse et l'export des polysaccharides extracellulaires en lien avec le cycle cellulaire, et notamment la ségrégation des chromosomes. Une nouvelle famille de protéine-kinases, UbK pour *Ubiquitous bacterial Kinase*, a récemment été découverte. Mon travail de thèse consiste à étudier la protéine-kinase UbK chez le pneumocoque.

Nous avons caractérisé le rôle d'UbK chez le pneumocoque. C'est une auto-tyrosine kinase, dont la présence est essentielle pour la croissance cellulaire et la morphogénèse de la bactérie. Par ailleurs, un excès d'autophosphorylation ou l'absence d'activité d'hydrolyse de l'ATP d'UbK sont également préjudiciables pour la croissance et la morphogénèse. Ces mutants d'*ubk* montrent une forme anormale, des septums de division mal positionnés et un écaillage de la paroi. Ces résultats suggèrent qu'un niveau de phosphorylation d'UbK contrôlé est nécessaire pour le « fitness » bactérien et ont conduit à une publication dans *Frontiers in Microbiology*, présentée dans la première partie des résultats.

Par ailleurs, la délétion d'*ubk* conduit à l'apparition d'une mutation suppressive dans le gène *asnS* codant pour l'AsparaginyI-ARNt-synthétase. Nous avons cherché à mettre en évidence le lien entre AsnS et la protéine-kinase UbK, en explorant le fait qu'AsnS pourrait être un substrat ancestral d'UbK, que la mutation suppressive rendrait non susceptible à la phosphorylation.

Ubk est présent dans un opéron de gènes induits lors de la compétence. Nous avons donc étudié le rôle d'UbK lors de la compétence. Nous avons montré qu'UbK contrôle l'expression de gènes tardifs lors de la compétence, ce qui impacte la transformation bactérienne.

L'absence d'*ubk* génère de graves défauts, traduisant un impact sur la division cellulaire. Nous avons donc examiné la composition de la paroi et localisé différentes protéines de la division, dont FtsZ et FtsA. Nous avons également mis en évidence des défauts du nucléoïde.

L'ensemble de ces résultats ont conduit à un modèle selon lequel UbK est un acteur du contrôle de la croissance, de la morphogénèse, de la compétence et de la division cellulaire.



# Matériel et Méthodes





## I. Souches et conditions de culture

### 1. Souches et conditions de culture de *S. pneumoniae*

Les souches du pneumocoque utilisées dans cette étude sont dérivées de la souche non capsulée R800 (Tableau 2). Elles sont ensemencées au 1/100<sup>ème</sup> et cultivées à 37°C sans agitation en milieu THY (Todd Hewitt supplémenté avec de l'extrait de levure) ou en milieu C+Y (Tableau 3). Leur croissance est suivie par spectrophotométrie à la Densité Optique de 550 nm (DO<sub>550nm</sub>). Les antibiotiques sont utilisés aux concentrations finales suivantes : Streptomycine 200 µg/mL, Kanamycine 250 µg/mL, Spectinomycine 100 µg/mL et Chloramphénicol 4.5 µg/mL.

Nom	Génotype	Amorces utilisées	Résistance antibiotique	Référence
<b>R800</b>	R800 <i>rpsL::rpsL1</i>		StrR	(Fleurie et al., 2012)
<b><i>Δubk::kan-rpsL</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, Δubk::kan-rpsL, asnS D121A</i>	39-40	KanR, StrS	(Pelletier et al., 2019)
<b><i>Δubk::spc-rpsL</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, Δubk::spc-rpsL, asnS D121A</i>	39-40	SpcR, StrS	(Pelletier et al., 2019)
<b><i>Δubk</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, Δubk, asnS D121A</i>	39-40	StrR	(Pelletier et al., 2019)
<b><i>RB (Repair Back)</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, asnS D121A</i>	39-40	StrR	(Pelletier et al., 2019)
<b><i>ubk K36R</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ubk K36R, asnS D121A</i>	39-40	StrR	(Pelletier et al., 2019)
<b><i>ubk Y58F</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ubk Y58F, asnS D121A</i>	39-40	StrR	(Pelletier et al., 2019)
<b><i>ubk Y58E</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ubk Y58E, asnS D121A</i>	39-40	StrR	(Pelletier et al., 2019)
<b><i>gfp-ubk</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1 ; gfp-ubk, asnS D121A</i>	39-40	StrR	(Pelletier et al., 2019)

<b><i>ubk K36R-Y58E</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ubk K36R-Y58E, asnS D121A</i>	39-40	StrR	(Pelletier et al., 2019)
<b><i>asnS D121A</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, asnS D121A</i>	3-6	StrR	(Pelletier et al., 2019)
<b><i>gfp</i><sup>CEP</sup></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, CEP[P<sub>m</sub>-gfp]</i>	21-22	StrR, KanR	(Pelletier et al., 2019)
<b><i>kan-rpsL-asnS</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, kan-rpsL-asnS</i>	3-5 ; 1-2 ; 4-6	KanR, StrS	Cette étude
<b><i>gfp-asnS</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, gfp-asnS</i>	3-9 ; 7-8 ; 10-6	StrR	Cette étude
<b><i>kan-rpsL-asnS D121A</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, kan-rpsL-asnS D121A</i>	3-5 ; 1-2 ; 4-6	KanR, StrS	Cette étude
<b><i>gfp-asnS D121A</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, gfp-asnS D121A</i>	3-9 ; 7-8 ; 10-6	StrR	Cette étude
<b><i>asnS D121Y</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, asnS D121Y</i>	3-5 ; 1-2 ; 4-6	StrR	Cette étude
<b><i>kan-rpsL-asnS D121Y</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, kan-rpsL-asnS D121Y</i>	3-9 ; 7-8 ; 10-6	KanR, StrS	Cette étude
<b><i>flag-asnS</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, flag-asnS</i>	3-11 ; 12-6	StrR	Cette étude
<b><i>flag-asnS D121Y</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, flag-asnS D121Y</i>	3-11 ; 12-6	StrR	Cette étude
<b><math>\Delta</math>gnat::<i>kan-rpsL</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, <math>\Delta</math>gnat::<i>kan-rpsL</i></i>	13-15 ; 1-2 ; 16-14	KanR, StrS	Cette étude
<b><i>gnat-gfp</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, gnat-gfp</i>	13-19 ; 17-18 ; 20-14	StrR	Cette étude
<b><i>P<sub>comE</sub>-gfp, ssbB::luc, comC0</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, <math>\Delta</math>IS1167::<i>P<sub>comE</sub>-gfp, comCo, ssbB::luc</i></i>		KanR, Cm	(Bergé et al., 2017)
<b><i>P<sub>comE</sub>-gfp</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, <math>\Delta</math>IS1167::<i>P<sub>comE</sub>-gfp</i></i>	21-22	KanR, StrR	Cette étude
<b><i>P<sub>comE</sub>-gfp <math>\Delta</math>ubk</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, <math>\Delta</math>IS1167::<i>P<sub>comE</sub>-gfp, <math>\Delta</math>ubk</i></i>	21-22	KanR, StrR	Cette étude
<b><i>P<sub>ssbB</sub>-gfp, ssbB ::luc, comC0</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, <math>\Delta</math>IS1167::<i>P<sub>ssbB</sub>-gfp, comCo, ssbB::luc</i></i>	21-22	KanR, Cm	(Bergé et al., 2017)
<b><i>P<sub>ssbB</sub>-gfp</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, <math>\Delta</math>IS1167::<i>P<sub>ssbB</sub>-gfp</i></i>	21-22	KanR, StrR	Cette étude

<b>P<sub>ssbB</sub>-gfp Δubk</b>	R800 <i>rpsL</i> :: <i>rpsL1</i> , <i>ΔIS1167</i> :: <i>P<sub>ssbB</sub>-gfp</i> , <i>Δubk</i>	21-22	KanR, StrR	Cette étude
<b>ΔbgaANter::P<sub>comX</sub>-kan-rpsL</b>	R800 <i>rpsL</i> :: <i>rpsL1</i> , <i>Δspr0565Nter</i> :: <i>P<sub>comX</sub>-kan-rpsL</i> ,	23-26 ; 25-2 ; 27-24	KanR, StrS	Cette étude
<b>P<sub>comX</sub>-kan-rpsL (locus cpsN-cpsO)</b>	R800 <i>rpsL</i> :: <i>rpsL1</i> , <i>ΔIS1167</i> :: <i>P1</i> :: <i>P<sub>comR</sub>-comR</i> , <i>cpsN-cpsO</i> :: <i>P<sub>comX</sub>-kan-rpsL</i>		KanR, StrS	(Zucchini et al., 2017)
<b>ΔbgaANter::P<sub>comR</sub>-comR</b>	R800 <i>rpsL</i> :: <i>rpsL1</i> , <i>Δspr0565Nter</i> :: <i>P1</i> :: <i>P<sub>comR</sub>-comR</i>	23-29 ; 31-32 ; 30-28	StrR	Cette étude
<b>P<sub>comX</sub>-kan-rpsL</b>	R800 <i>rpsL</i> :: <i>rpsL1</i> , <i>Δspr0565Nter</i> :: <i>P1</i> :: <i>P<sub>comR</sub>-comR</i> , <i>cpsN-cpsO</i> :: <i>P<sub>comX</sub>-kan-rpsL</i>	31-32	KanR, StrS	Cette étude
<b>P<sub>comX</sub>-ubk</b>	R800 <i>rpsL</i> :: <i>rpsL1</i> , <i>Δspr0565Nter</i> :: <i>P1</i> :: <i>P<sub>comR</sub>-comR</i> , <i>cpsN-cpsO</i> :: <i>P<sub>comX</sub>-ubk</i>	31-37 ; 35-36 ; 38-32	StrR	Cette étude
<b>P<sub>comX</sub>-ubk Δubk::kan-rpsL</b>	R800 <i>rpsL</i> :: <i>rpsL1</i> , <i>Δspr0565Nter</i> :: <i>P1</i> :: <i>P<sub>comR</sub>-comR</i> , <i>cpsN-cpsO</i> :: <i>P<sub>comX</sub>-ubk</i> , <i>Δubk</i> :: <i>kan-rpsL</i> , <i>AsnS D121A</i>	39-40	KanR, StrS	Cette étude
<b>P<sub>comX</sub>-ubk Δubk</b>	R800 <i>rpsL</i> :: <i>rpsL1</i> , <i>Δspr0565Nter</i> :: <i>P1</i> :: <i>P<sub>comR</sub>-comR</i> , <i>cpsN-cpsO</i> :: <i>P<sub>comX</sub>-ubk</i> , <i>Δubk</i> , <i>AsnS D121A</i>	39-40	StrR	Cette étude
<b>P<sub>comX</sub>-ubk Δubk P<sub>ssbB</sub>-GFP</b>	R800 <i>rpsL</i> :: <i>rpsL1</i> , <i>Δspr0565Nter</i> :: <i>P1</i> :: <i>P<sub>comR</sub>-comR</i> , <i>cpsN-cpsO</i> :: <i>P<sub>comX</sub>-ubk</i> , <i>Δubk</i> , <i>AsnS D121A</i> , <i>ΔIS1167</i> :: <i>P<sub>ssbB</sub>-gfp</i>	21-22	KanR, StrR	Cette étude
<b>P<sub>ssbB</sub>-gfp RB</b>	R800 <i>rpsL</i> :: <i>rpsL1</i> , <i>ΔIS1167</i> :: <i>P<sub>ssbB</sub>-gfp</i> , <i>asnS D121A</i>	21-22	StrR	Cette étude
<b>comM T1T2</b>	R800 <i>rpsL</i> :: <i>rpsL1</i> , <i>comM-T1T2</i>		StrR	(Bergé et al., 2017)
<b>comM T1T2</b>	R800 <i>rpsL</i> :: <i>rpsL1</i> , <i>comM-T1T2</i>	39-40	StrR	Cette étude
<b>comM T1T2 P<sub>comE</sub>-gfp</b>	R800 <i>rpsL</i> :: <i>rpsL1</i> , <i>comM-T1T2</i> , <i>ΔIS1167</i> :: <i>P<sub>comE</sub>-gfp</i>	21-22	KanR, StrR	Cette étude
<b>comM T1T2 P<sub>ssbB</sub>-gfp</b>	R800 <i>rpsL</i> :: <i>rpsL1</i> , <i>comM-T1T2</i> , <i>ΔIS1167</i> :: <i>P<sub>ssbB</sub>-gfp</i>	21-22	KanR, StrR	Cette étude
<b>comM T1T2 gfp-ubk</b>	R800 <i>rpsL</i> :: <i>rpsL1</i> , <i>gfp-ubk</i>	39-41 ; 42-40	StrR	Cette étude
<b>ftsZ-stop-gfp, comC0</b>	R800 <i>rpsL</i> :: <i>rpsL1</i> , <i>ftsZ-stop-gfp</i> , <i>comC0</i>	43-44	StrR	(Bergé et al., 2017)

<b><i>ftsZ-kan-rpsL</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ftsZ-kan-rpsL</i>	43-44	KanR, StrS	(Fleurie et al., 2014b)
<b><i>ftsZ-stop-gfp</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ftsZ-stop-gfp</i>	43-44	StrR	Cette étude
<b><i>ftsZ-gfp</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ftsZ-gfp</i>	43-44	StrR	(Fleurie et al., 2014b)
<b><i>ftsZ-kan-rpsL Δubk</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ftsZ-kan-rpsL, Δubk</i>	43-44	KanR, StrS	Cette étude
<b><i>ftsZ-stop-gfp Δubk</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ftsZ-stop-gfp, Δubk</i>	43-44	StrR	Cette étude
<b><i>ftsZ-gfp Δubk</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ftsZ-gfp, Δubk</i>	43-44	StrR	Cette étude
<b><i>kan-rpsL-endA</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, kan-rpsL-endA</i>	45-47 ; 1-2 ; 48-46	KanR, StrS	Cette étude
<b><i>mkate2-endA</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, mkate2-endA</i>	45-51 ; 49-50 ; 52-46	StrR	Cette étude
<b><i>kan-rpsL-endA Δubk</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, kan-rpsL-endA, Δubk</i>	45-46	KanR, StrS	Cette étude
<b><i>mkate2-endA Δubk</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, mkate2-endA, Δubk</i>	45-46	StrR	Cette étude
<b><i>P<sub>ssbB</sub>-gfp ubk K36R</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ΔIS1167::P<sub>ssbB</sub>-gfp, ubk K36R</i>	21-22	KanR, StrR	Cette étude
<b><i>P<sub>ssbB</sub>-gfp ubk Y58F</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ΔIS1167::P<sub>ssbB</sub>-gfp, ubk Y58F</i>	21-22	KanR, StrR	Cette étude
<b><i>P<sub>ssbB</sub>-gfp ubk Y58E</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ΔIS1167::P<sub>ssbB</sub>-gfp, ubk Y58E</i>	21-22	KanR, StrR	Cette étude
<b><i>P<sub>comE</sub><sup>-</sup>-gfp RB</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ΔIS1167::P<sub>comE</sub><sup>-</sup>-gfp, asnS D121A</i>	21-22	KanR, StrR	Cette étude
<b><i>P<sub>comE</sub><sup>-</sup>-gfp ubk K36R</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ΔIS1167::P<sub>comE</sub><sup>-</sup>-gfp, ubk K36R</i>	21-22	KanR, StrR	Cette étude
<b><i>P<sub>comE</sub><sup>-</sup>-gfp ubk Y58F</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ΔIS1167::P<sub>comE</sub><sup>-</sup>-gfp, ubk Y58F</i>	21-22	KanR, StrR	Cette étude
<b><i>P<sub>comE</sub><sup>-</sup>-gfp ubk Y58E</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, ΔIS1167::P<sub>comE</sub><sup>-</sup>-gfp, ubk Y58E</i>	21-22	KanR, StrR	Cette étude
<b><i>kan-rpsL-ftsA</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, kan-rpsL-ftsA</i>	53-55 ; 1-2 ; 56-54	KanR, StrS	Cette étude
<b><i>gfp-ftsA</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, gfp-ftsA</i>	53-57 ; 7-8 ; 58-54	StrR	Cette étude

<b><i>kan-rpsL-ftsA, asnS D121A</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, kan-rpsL-ftsA, asnS D121A</i>	53-54	KanR, StrS	Cette étude
<b><i>gfp-ftsA, asnS D121A</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, gfp-ftsA, asnS D121A</i>	53-54	StrR	Cette étude
<b><i>gfp-ftsA Δubk::kan-rpsL</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, gfp-ftsA, asnS D121A, Δubk::kan-rpsL</i>	39-40	KanR, StrS	Cette étude
<b><i>gfp-ftsA Δubk</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1, gfp-ftsA, asnS D121A, Δubk</i>	39-40	StrR	Cette étude
<b><i>hlpA-mkate2</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1; hlpA::hlpA-mkate2</i>	59-60	StrR, Cm	(Mercy et al., 2019)
<b><i>hlpA-mkate2 Δubk</i></b>	R800 <i>rpsL::rpsL1; hlpA::hlpA-mkate2, Δubk</i>	59-60	StrR, Cm	Cette étude

**Tableau 2 : Souches de *Streptococcus pneumoniae* utilisées dans cette étude.** Str, Kan, Spc et Cm correspondent aux antibiotiques Streptomycine, Kanamycine, Spectinomycine et Chloramphénicol respectivement. Le suffixe R ou S après l'antibiotique indique une Résistance R ou une Sensibilité S.

<i>Composants</i>	<i>Concentration finale</i>
<i>L-cystéine</i>	58.3 μM
<i>Sodium acétate</i>	22.2 mM
<i>Hydrolysate de caséine</i>	0.45% (m/v)
<i>L-tryptophane</i>	26.8 μM
<i>Hydrogénophosphate de potassium</i>	33.9 μM
<i>Chlorure de Manganèse anhydride</i>	0.36 μM
<i>L-glutamine</i>	136 μM
<i>D-glucose</i>	10.1 mM
<i>Sodium pyruvate</i>	2.5 mM
<i>D-saccharose</i>	0.86 mM
<i>Uridine</i>	73.7 μM
<i>Adénosine</i>	67.4 μM
<i>BSA (Serum Albumine Bovine)</i>	10.5 μM
<i>Extrait de levure</i>	0.23% (m/v)
<i>L-Asparagine</i>	0.34 mM
<i>Choline</i>	43.7 mM
<i>Chlorure de calcium anhydride</i>	0.1025 mM
<i>Sulfate de fer heptahydrate</i>	1.64 μM
<i>Sulfate de cuivre pentahydrate</i>	1.83 μM
<i>Sulfate de zinc heptahydrate</i>	1.58 μM
<i>Chlorure de manganèse tétrahydrate</i>	0.92 μM
<i>Chlorure de magnésium hexahydrate</i>	2.24 mM

**Tableau 3 : Composition du milieu C+Y.**

## 2. Courbes de croissance de *S. pneumoniae*

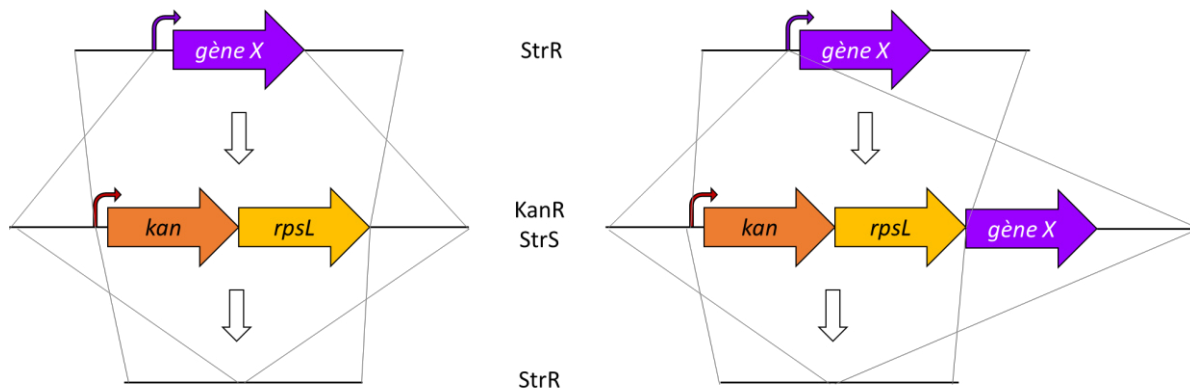
Les souches du pneumocoque sont ensemencées au 1/100<sup>ème</sup> dans 4 mL de THY et cultivées à 37°C jusqu'à DO<sub>550nm</sub> comprise entre 0.1 et 0.3. La culture est diluée à DO<sub>550nm</sub>=0.001 dans des cuves contenant 4 mL de THY. La croissance est suivie par mesure de la DO à 550 nm toutes les 10 min à 37°C à l'aide d'un spectrophotomètre Jasco V630 Bio®.

## 3. Transformation de *S. pneumoniae*

Les différents mutants de *S. pneumoniae* ont été construits en utilisant la cassette Janus *kan-rpsL*, qui introduit une cassette de résistance à la Kanamycine *kan* suivi du gène *rpsL* codant pour une protéine du ribosome, sous le contrôle d'un unique promoteur (Sung et al., 2001). Les souches R800 et D39 au laboratoire possèdent l'allèle muté de *rpsL*, *rpsL1*, qui confère la résistance à la Streptomycine, et est récessif par rapport à *rpsL*. Ainsi, l'intégration de la cassette Janus dans le génome du pneumocoque génère une résistance à la Kanamycine, et restaure la sensibilité à la Streptomycine. Différentes stratégies de substitution ont été utilisées dans cette étude en fonction de la construction à réaliser. Ainsi, la cassette peut substituer le cadre ouvert de lecture d'un gène, ou être positionnée en amont ou en aval (Figure 44).

Dans cette optique, les souches de pneumocoque sont cultivées à 37°C jusqu'à DO<sub>550nm</sub>=0.1 dans 15 mL de THY pH=6.8, pour inhiber la compétence spontanée. La culture est ensuite centrifugée 5 min à 5 000 g, et le culot resuspendu dans 1/10<sup>ème</sup> du volume initial. 100 µL des cellules concentrées sont ajoutées dans 900 µL de TTM (THY, BSA 2 g/L, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH=7.8), additionné de CSP 10 ng/mL pour induire la compétence des cellules. 100 µL de ce mélange est mis en contact avec 10 ng d'ADN, et incubé 10 min à 37°C puis 20 min à 30°C. Les cellules sont étalées à différentes dilutions dans 10 mL de gélose THY-agar supplémenté par 3-5% de sang de cheval défibriné (v/v) dans une boîte de Petri, et incubé 2 h à 37°C pour permettre l'expression phénotypique. Ensuite, une seconde couche de 10 mL de THY-agar est ajoutée, contenant l'antibiotique permettant la sélection des clones, et incubée la nuit à 37°C. Les clones sont ensuite vérifiés par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) et test antibiotique, et séquencés par Eurofins genomics®. Le pourcentage de transformation est déterminé en

comptant le nombre de clones par rapport à un étalement sans antibiotique, et permet d'appréhender l'apparition de mutations suppressives s'il est relativement faible.



**Figure 44 : Schéma de la stratégie de délétion d'un gène par la cassette Janus.** Le gène X (en violet) est sous le contrôle de son propre promoteur (flèche violette) dans une souche résistante la Streptomycine (StrR). Le panel de gauche montre la substitution de ce gène par la cassette Janus kan-rpsL (en orange et jaune respectivement) sous le contrôle de son propre promoteur (flèche marron) qui confère la résistance à la Kanamycine et la sensibilité à la Streptomycine (KanR, StrS). Cette cassette peut être enlevée et va restaurer la sensibilité à la Streptomycine. De la même manière, le panel de droite montre l'ajout de la cassette en amont du gène, qui peut être également en aval (non représenté ici). Les traits gris correspondent aux recombinaisons homologues.

#### 4. Souches et conditions de culture d'*E. coli*

Les souches d'*E. coli* utilisées dans cette étude sont XL1-Blue (XL1B) et BL21 (DE3) (Tableau 4). Elles sont cultivées dans le milieu Luria-Bertani LB à 37°C sous agitation en présence des antibiotiques appropriés.

Nom	Génotype	Résistance antibiotique	Référence
<b>XL1B</b>	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac- F'[proAB+ lacIq lacZΔM15 Tn10 (TcR)]</i>	TetR	(Bullock, 1987)
<b>BL21 (DE3)</b>	<i>F- ompT gal dcm lon hsdSB (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>		(Studier & Moffatt, 1986)

**Tableau 4 : Souches d'*E. coli* utilisées dans cette étude.** Tet correspond à l'antibiotique Tétracycline. Le suffixe R ou S après l'antibiotique indique une Résistance R.



La croissance est suivie par mesure de la DO à 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) au spectrophotomètre. Les antibiotiques sont utilisés à la concentration suivante : Ampicilline 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Kanamycine 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et Tétracycline 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

## 5. Transformation d'*E. coli*

Une préculture des souches d'*E. coli* est réalisée dans du LB avec les antibiotiques appropriés, et incubée à 37°C avec agitation sur la nuit pour amener la culture jusqu'à la phase stationnaire de croissance. La préculture est diluée au 1/100<sup>ème</sup> dans du LB contenant les antibiotiques adéquats, et incubé à 37°C sous agitation jusqu'à  $DO_{600nm}=0.4$ . La croissance de la culture est arrêtée 10 min à 4°C puis centrifugée 10 min à 5 000 g à 4°C. Le culot est repris par 1/5<sup>ème</sup> du volume initial de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M et placé dans la glace pendant 1 h. Les cellules sont de nouveau centrifugées 10 min à 5 000 g 4°C puis resuspendues avec 1/50<sup>ème</sup> du volume initial de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M avec du glycérol 15% (v/v). Les cellules compétentes peuvent être stockées à -80°C ou utilisées directement.

100  $\mu\text{L}$  de cellules compétentes sont mises en contact avec 10 ng d'ADN pendant 30 min dans la glace. Un choc thermique est réalisé pendant 50 s à 42°C puis les cellules sont replacées dans la glace pendant 1 min. 900  $\mu\text{L}$  de LB sont rajoutés et la culture est incubée pendant 1h30 à 37°C sous agitation pour permettre l'expression phénotypique. Les cellules sont étalées sur une gélose de LB-agar additionnée d'antibiotique dans un boîte de Petri et laissées la nuit à 37°C. Les clones sont ensuite vérifiés par PCR et séquençés par Eurofins genomics®.

## II. Techniques de biologie moléculaire

### 1. Amplification d'ADN par PCR

Le mélange réactionnel est composé de 0.02 U/ $\mu\text{L}$  d'ADN polymérase « Phusion » commercialisée par Thermo Scientific®, de 0.1 à 10 ng d'ADN matrice, de 200  $\mu\text{M}$  de désoxyribonucléotides triphosphates dNTPs, de 0.2  $\mu\text{M}$  d'amorces et du tampon adéquat

provenant du fournisseur. La réaction se déroule dans le thermocycleur MJ Mini® de Biorad®. La première phase consiste à dénaturer les doubles brins d'ADN pendant 30 s à 98°C puis est suivie d'une succession de 30 cycles pour amplifier en quantité suffisante l'ADN matrice. Ces cycles sont composés d'une phase de dénaturation des brins d'ADN pendant 10 s à 98°C, d'une étape d'hybridation des amorces pendant 30 s dépendante de leur température de fusion, et de l'élongation à 72°C à raison de 30 s/kb. L'élongation finale est réalisée pendant 10 min à 72°C.

Une autre ADN polymérase est utilisée au laboratoire pour vérifier les clones de transformation en se basant sur le critère de taille du fragment sélectionné. Le mélange réaction est composé de 0.025 U/μL de l'enzyme DreamTaq commercialisée par Thermo Scientific®, de 10 pg à 1 μg d'ADN matrice, de 200 μM de dNTPs, de 0.1 à 1 μM d'amorces dans un tampon adéquat issu du fournisseur. La dénaturation initiale est réalisée pendant 3 min à 95°C, suivi de 25 cycles de 30 s à 95°C de dénaturation, d'hybridation pendant 30 s dépendant de la température de fusion des amorces, et d'une extension de 1 min jusqu'à 2 kb et au-delà de 1 min/kb. L'élongation finale est réalisée pendant 10 min à 95°C.

Le contenu de la PCR est ensuite analysé par électrophorèse sur gel d'agarose (voir la partie dédiée). Les amorces utilisées pour réaliser la construction des souches de cette étude sont présentées dans le tableau 5.

N°	Nom	Séquence 5'→3'
1	<i>kan-rpsL</i> (+)	CCGTTTGATTTTTAATGGATAATG
2	<i>kan-rpsL</i> (-)	AGAGACCTGGGCCCTTTCC
3	<i>asnS</i> amont (+)	GCAGCAGTTGAGGCTCTATCAGG
4	<i>asnS</i> aval (-)	GGTAAGTGAGGTTTCGCTCAC
5	<i>kan-rpsL</i> - amont- <i>asnS</i> (-)	CATTATCCATTAAAAATCAAACGGTATTTTTCTTTTCTTTTTTATTCTTTATGG C (complémentaire de 1)
6	<i>kan-rpsL</i> - <i>asnS</i> (+)	GGAAAGGGGCCAGGTCTCTATGACAAAACGTGTAACGATTATTGATG (complémentaire de 2)
7	<i>gfp</i> (+)	ATGATTTCTAAAGGTGAAGAATTG
8	<i>gfp-linker1</i> (-)	TCCGGATCCCTCGAGTTTATACAATTCATCCATACCATGTG (complémentaire au <i>linker1</i> )
9	<i>gfp</i> - <i>asnS</i> - amont (-)	CAATTCTTCACCTTAGAAATCATTTTTCTTTTCTTTTTTATTCTTTATGG C (complémentaire de 7)
10	<i>gfp</i> - <i>asnS</i> (+)	GTATAAACTCGAGGGATCCGGAATGACAAAACGTGTAACGATTATTGATG (complémentaire de 8)

11	<i>flag-asnS</i> - amont (-)	TCCGGATCCCTCGAGTTTATCGTCGTCATCTTTGAGTCGATATCATGATCTTTAT ATCACCGTCATGGTCTTTGAGTCCATTATTTTTCTTTTCTTTTTATTCTTTATGG CAAAC (complémentaire au <i>flag</i> et au <i>linker1</i> )
12	<i>flag-asnS</i> (+)	ATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGATATCGACTACAAA GATGACGACGATAAACTCGAGGGATCCGGAATGACAAAACGTGTAACGATTATT GATG (correspond au <i>flag</i> et au <i>linker1</i> )
13	<i>gnat</i> -amont (+)	AGACAGTGTGGTGACTATTTTAGC
14	<i>gnat</i> -aval (-)	CAATATTGGTCTGCATATTGTCACCTC
15	$\Delta$ <i>gnat::kan-</i> <i>rpsL</i> -amont (-)	CATTATCCATTA AAAATCAAACGGTCATACTCCATATTGAAGCTCCTC (complémentaire de 1)
16	$\Delta$ <i>gnat::kan-</i> <i>rpsL</i> -aval (+)	GGAAAGGGGCCAGGTCTCTGATAGGTTAGTAGAAATATGGTTAAAAAAT TATTGG (complémentaire de 2)
17	<i>linker2-gfp</i> (+)	AACTAGACATCGAGTTCCTGCAGATGATTCTAAAGGTGAAGAATTG (correspond au <i>linker2</i> )
18	<i>gfp</i> (-)	TTATTATACAATTCATCCATACC
19	<i>gnat-gfp</i> (-)	CTGCAGGAACTCGATGTCTAGTTTACCTATCAGTTTACCCATCAAG (complémentaire à 17)
20	<i>gnat-gfp</i> -aval (+)	GGTATGGATGAATTGTATAAATAAGATAGGTTAGTAGAAATATGGTTAAAAA ATTATTG (complémentaire à 18, correspond au RBS de <i>LytR</i> )
21	<i>treR</i> (+)	ATGAAGAAATACCAACAATTATTTAAGCAAATCC
22	<i>amiF</i> (-)	ACCCTCATGAATTCTCAGGCGGT
23	<i>bgaA</i> -amont (+)	GATTGCTACAGCAGCTATCG
24	<i>bgaA</i> (-)	GCCGGCTGTATCTACGATACC
25	<i>P<sub>comX</sub>-kan-rpsL</i>	GGTTTTGACTCTATCTCGCTTATTTAATTG
26	$\Delta$ <i>spr0565Nter:</i> : <i>P<sub>comX</sub>-kan-rpsL</i> (-)	CAATTAATAAGCGAGATAGAGTCAAACCCAAAACCCTCCTTATATTATATT TAGTGC (complémentaire à 25)
27	$\Delta$ <i>spr0565Nter:</i> : <i>P<sub>comX</sub>-kan-rpsL</i> (+)	GGAAAGGGGCCAGGTCTCTGATGCGATTTTAGAAGTTGAAAGAC (complémentaire de 2)
28	<i>bgaA</i> -aval (-)	GTTCCAGACTCTTTATCTTC
29	<i>spr0564</i> (-)	GGAGCGCATTATTTTGCTTTTGC
30	<i>bgaA</i> (+)	CTGGTGATGAAATCAACGTAACATTTAAAG
31	$\Delta$ <i>spr0565Nter:</i> : <i>P<sub>comR</sub>-comR</i> (+)	AGCAAATAATGCGCTCCGGATAATCAAGATTTATCTTATAAAAAATATT (complémentaire à 29)
32	$\Delta$ <i>spr0565Nter:</i> : <i>P<sub>comR</sub>-comR</i> (-)	TACGTTGATTTATCACCAGTTTCTATAAACCATCTGCCAATTTTCC (complémentaire à 30)
33	<i>cpsN-</i> <i>cpsO::P<sub>comX</sub>-</i> <i>kan-rpsL</i> (+)	CATCGGAACCTATACTCTTTTAG
34	<i>cpsN-</i> <i>cpsO::P<sub>comX</sub>-</i> <i>kan-rpsL</i> (-)	ATAACAAATCCAGTAGCTTTGG

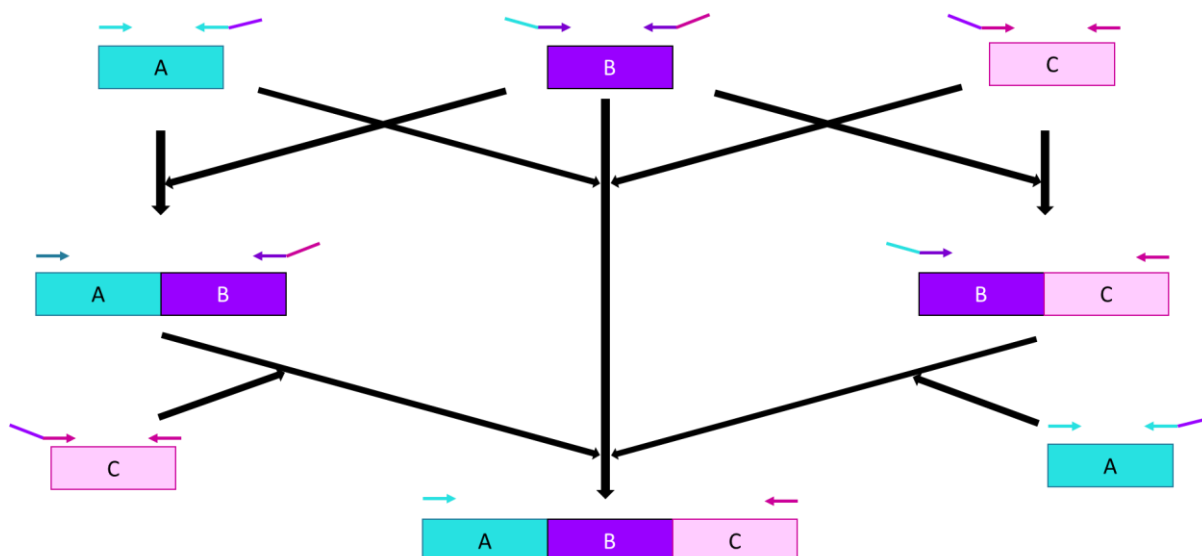
35	<i>ubk</i> (+)	TCATACTCCATATTGAAGCTCCTC
36	<i>ubk</i> (-)	ATGTACACAAAAAATGAAGAAGAGTTGC
37	<i>P<sub>comX</sub>-ubk</i> (+)	GAGGAGCTTCAATATGGAGTATGATTTCTAATATGTAACCTCTCCCAAT (complémentaire de 35)
38	<i>P<sub>comX</sub>-ubk</i> (-)	GCAACTCTTCTTCATTTTTTGTGTACATGTAACCTCCAATAATAAATATAAAT (complémentaire de 36)
39	<i>ubk</i> -amont (+)	ATACCTCCTACTGCATCCAC
40	<i>ubk</i> -aval (-)	ACTCTGAGTCCGTCTCGC
41	<i>comM-T1T2-gfp-ubk</i> -amont (-)	CAATTCTTCACCTTTAGAAATCATACTCTTATTATACCAAAAACCTTTCTTTTG TG (complémentaire de 7)
42	<i>comM-T1T2-gfp-ubk</i> (+)	CACAAAAGAAAAGTTTTTGGTATAATAAGAGTATGATTTCTAAAGGTGAAG AATTG (correspond à 7)
43	<i>ftsZ</i> -amont (+)	CCTATCCGCCTCTTGCAAGC
44	<i>ftsZ</i> -aval (-)	CTTTTAAAGACATGGTTCTCTCCTAC
45	<i>endA</i> -amont (+)	GTTTCCAACACCTAGAAGAGATG
46	<i>endA</i> -aval (-)	CACACGTCCTAGAGTATTAGTTAAAC
47	<i>kan-rpsL-endA</i> -amont (-)	CATTATCCATTA AAAATCAAACGGATTTCCTTATCTTTAGAAAAAGGCTG (complémentaire de 1)
48	<i>kan-rpsL-endA</i> (+)	AGGAAAGGGGCCAGGTCTCTATGAACAAAAAACAAGACAGACACTAAT C (complémentaire de 2)
49	<i>mkate2</i> (+)	ATGTCAGAACTTATCAAGGAAAATATG
50	<i>mkate2-linker3</i> (-)	TCCTTTAGCTGGCAGCTTCTCCACCAGATCCGGATCCACGGTGTCCCAATTT AC (correspond au linker3)
51	<i>mkate2-endA</i> -amont (-)	CATATTTTCCTTGATAAGTTCTGACATATTTCTCCTTATCTTTAGAAAAAGGC TGG (complémentaire à 49)
52	<i>mkate2-endA</i> (+)	GTAAATTGGGACACCGTGGATCCGGATCTGGTGGAGAAGCTGCAGCTAAA GGAATGAACAAAAAACAAGACAGACACTAATC (complémentaire à 50 avec le linker3)
53	<i>ftsA</i> -amont (+)	GGTTGGTACTGGGTCAATCATATGC
54	<i>ftsA</i> -aval (-)	ctaccacacggtctctcactac
55	<i>kan-rpsL-ftsA</i> -amont (-)	CATTATCCATTA AAAATCAAACGGTCTGTGTTAAGCTTCCTTTGCAATCATT TTTC (complémentaire de 1)
56	<i>kan-rpsL-ftsA</i> (-)	GGAAAGGGGCCAGGTCTCTGCTTTCTTTTTGCTCTTAGAGAGTTTTTAC (complémentaire de 2)
57	<i>gfp-ftsA</i> -amont (-)	CAATTCTTCACCTTTAGAAATCATTACATCGCTCCTCTCTATCTTCCAAG (complémentaire de 7)
58	<i>gfp-ftsA</i> (+)	GTATAAACTCGAGGGATCCGGAATGGCTAGAGAAGGCTTTTTTACAGG (complémentaire de 8)
59	<i>hlpA</i> -amont (+)	CGAAGTTAGCTCAAGAAG
60	<i>hlpA</i> -aval (-)	CAGGTTGATATTATCG

61	<i>stkP</i> -amont (+)	GGTCAGGTTACTGCTCTGGAC
62	<i>stkP</i> -aval (-)	GAAAGGAGCACTAAAGGTCGC
63	$\Delta$ <i>spr0565Nter</i> : : <i>P<sub>comX</sub></i> (-)	TGAACCTCCAATAATAAATATAAAT
64	$\Delta$ <i>spr0565Nter</i> : : <i>P<sub>comX</sub></i> (+)	GATGCGATTTTAGAAGTTGAAAGAC
65	<i>P<sub>comX</sub></i> - <i>gfp-ubk</i> (+)	ATATTTATTATTGGAGGTTCAATGATTTCTAAAGGTGAAGAATTG (complémentaire à 63)
66	<i>P<sub>comX</sub></i> - <i>gfp-ubk</i> (-)	GTCTTTCAACTTCTAAAATCGCATCTCATACTCCATATTGAAGCTC (complémentaire à 64)
67	<i>NdeI-ubk</i> (+)	GGGAATTCCATATGTACACAAAAAATGAAGAAGAGTTG ( <i>NdeI</i> )
68	<i>ubk</i> - <i>Bam</i> HI (-)	TATGGATCCTCATACTCCATATTGAAGCTCCTC ( <i>Bam</i> HI)
69	<i>NdeI-asnS</i> (+)	GGGAATTCCATATGACAAAACGTGTAACGATTATTGATG ( <i>NdeI</i> )
70	<i>asnS</i> - <i>Bam</i> HI (-)	TATGGATCCTTATGGTTTGATACGGTGCAACATAC ( <i>Bam</i> HI)
71	<i>Bam</i> HI- <i>gnat</i> (+)	TATGGATCCATGGAGTATGAATTGCTCATTAGGG ( <i>Bam</i> HI)
72	<i>gnat</i> - <i>Hind</i> III (-)	TATAAGCTTCTAACCTATCAGTTTACCCATCAAG ( <i>Hind</i> III)

**Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour les constructions de souches ou de plasmides.** Les séquences colorées indiquent l'extension de l'amorce.

## 2. Construction de fragments d'ADN par PCR d'hybridation

Les différents fragments d'ADN sont amplifiés individuellement par PCR (Phusion) puis combinés les uns des autres selon plusieurs possibilités, puis ré-amplifiés par PCR pour aboutir au fragment A-B-C (Figure 45). En général, les fragments composant les extrémités sont homologues aux régions bordant la future construction afin de réaliser la recombinaison homologue. Après vérification de la présence d'une bande de la taille attendue sur gel d'agarose, le fragment final est purifié sur gel et transformé (voir partie dédiée).



**Figure 45 : Construction d'un fragment d'ADN par PCR d'hybridation.** Les différents fragments constituant le fragment final A-B-C (rectangle turquoise, violet et rose respectivement) sont amplifiés individuellement par PCR avec des amorces possédant des extensions (flèches à double couleur). Les différents fragments sont combinés les uns avec les autres A-B (à gauche), B-C (à droite) ou A-B-C (au milieu). Une seconde étape peut être nécessaire pour laquelle le fragment C est ajouté à A-B, et le fragment A à B-C.

### 3. Electrophorèse des fragments d'ADN sur gel d'agarose

L'ADN issu de la PCR est additionné d'un tampon de charge (Bleu de Bromophénol 0.04% (v/v), Xylène Cyanol 0.04% (v/v), Glycérol 5%, EDTA 1 mM) afin d'alourdir l'échantillon pour qu'il reste au fond du puit, ainsi que visualiser le dépôt et la migration par les colorants. L'échantillon est déposé dans les puits d'un gel d'agarose 1% (Agarose Seakem® de Lonka® 1% (m/v), TBE 0.5%) et migre dans une cuve d'électrophorèse Mupid®-One d'Advance®, en présence de tampon TBE 0.5% (m/v) (Tris 69 mM, Borate 69 mM, EDTA (*Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid*) 2 mM) pendant 30 min à 100 V. Après migration, le gel est incubé avec une solution de TBE 0.5% contenant du Bromure d'Ethidium BET qui s'intercale dans les bases de l'ADN et devient fluorescent sous exposition aux UVs. Le gel est révélé par un transilluminateur et la taille des fragments d'ADN obtenus par PCR est comparée avec un marqueur de masse moléculaire 100 pb ou 1 kb de Thermo Scientific®.

## 4. Purification d'ADN

Les fragments d'ADN sont purifiés avec le kit « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up » de Macherey-Nagel®. Deux volumes de tampon « Binding Buffer NTI » sont ajoutés à l'ADN provenant directement de la PCR, ou d'une bande découpée sur gel d'agarose 1% à la taille attendue et dissoute à 50°C. Ce tampon contient des sels chaotropiques qui déstabilisent les structures des molécules biologiques telles que l'ADN, l'ARN et les protéines, ainsi qu'un colorant indicateur de pH déterminant dans la fixation à la colonne ( $5 < \text{pH} < 6$ ). Le mélange est chargé sur une colonne contenant de la silice qui interagit avec l'ADN dénaturé chargé négativement. Deux lavages avec du « Wash Buffer NT3 » contenant de l'éthanol permettent d'éliminer les contaminants et les composés du mélange de PCR. L'ADN est élué par le tampon « Elution Buffer EB » contenant 5 mM de Tris-HCl pH=8.5, c'est-à-dire à faible concentration de sels et en conditions légèrement alcalines.

## 5. Digestion par des enzymes de restriction

L'ADN est digéré par des enzymes de restriction qui clivent des séquences spécifiques de l'ADN double brin. Le mélange réactionnel est composé d'1 µg d'ADN, de 5 à 10 U d'enzyme de NEB® dans son tampon adéquat et de 1 µg de BSA pour limiter le clivage aspécifique de l'enzyme éventuel. La digestion est réalisée pendant 1 h à 37°C puis les fragments d'ADN d'intérêt sont purifiés sur gel d'agarose et dosés au Nanodrop de Thermo Scientific® pour déterminer les quantités nécessaires à la ligation.

## 6. Ligation

50 ng de vecteur sont mis en contact avec l'insert dans un rapport molaire 5:1 (vecteur:insert) avec 1 à 3 U de ligase du phage T4 commercialisée par Promega® dans son tampon. Le mélange est incubé 16 h à 16°C puis transformé directement dans *E. coli*.

## 7. Extraction d'ADN plasmidique

Les plasmides utilisés dans cette étude sont présentés dans le Tableau 6.

Plasmide	Description	Amorces utilisées	Résistance antibiotique	Référence
<b>pETphoS</b>	Plasmide adapté pour l'expression de protéines possédant des phosphorésidus avec une étiquette 6His côté N-terminal des fusions ne possédant pas d'acides-aminés phosphorylables.		AmpR	(Canova et al., 2008)
<b>pETphoS-ubk</b>	Dérivé du pETphoS, code pour UbK avec une étiquette 6His côté N-terminal	67-68	AmpR	Cette étude
<b>pETphoS-asnS</b>	Dérivé du pETphoS, code pour AsnS avec une étiquette 6His côté N-terminal	69-70	AmpR	Cette étude
<b>pETphoS-asnS D121A</b>	Dérivé du pETphoS, code pour AsnS D121A avec une étiquette 6His côté N-terminal	69-70	AmpR	Cette étude
<b>pETphoS-asnS D121Y</b>	Dérivé du pETphoS, code pour AsnS D121Y avec une étiquette 6His côté N-terminal	69-70	AmpR	Cette étude
<b>pQE30</b>	Plasmide codant une étiquette 6His côté N-terminal des fusions		AmpR	Quiagen®
<b>pQE30-gnat</b>	Dérivé de pQE30, code pour GNAT avec une étiquette 6His côté N-terminal	71-72	AmpR	Cette étude

**Tableau 6 : Plasmides utilisés dans cette étude.** Amp et Kan correspondent aux antibiotiques Ampicilline et Kanamycine respectivement. Le suffixe R ou S après l'antibiotique indique une Résistance R.

L'ADN plasmidique ADNp est purifié avec le kit « NucleoSpin® Plasmid » de Macherey-Nagel®. Le culot issu d'une préculture bactérienne est repris par le tampon A1 en présence de RNase. Le plasmide est libéré de son hôte *E. coli* par lyse alcaline (pH=13) et du SDS contenu dans le tampon A2. Le tampon A3 neutralise le mélange et crée les conditions appropriées pour la liaison de l'ADN à la colonne en présence de sels chaotropiques. Dans ces conditions, les protéines précipitées, l'ADN génomique et les débris cellulaires sont précipités par une étape de centrifugation. Le surnageant contenant l'ADNp est chargé sur une colonne contenant une membrane de silice et les contaminants lavés avec le tampon A4 possédant de l'éthanol. Une étape de lavage supplémentaire est réalisée avec le tampon AW si l'hôte cellulaire



possède de hauts niveaux de nucléases. Le plasmide final est élué par un tampon ayant une faible concentration de sel et en conditions légèrement alcaline (5 mM Tris-HCl pH=8.5).

### III. Techniques de biochimie

#### 1. Préparation d'extraits protéiques totaux de *S. pneumoniae*

Les souches sont ensemencées au 1/100<sup>ème</sup> dans 15 mL de milieu C+Y et cultivées à 37°C jusqu'à  $DO_{550nm}=0.3$ . Dans le cadre de l'étude de la compétence, les cellules poussent jusqu'à  $DO_{550nm}=0.1$  et sont incubées 20 min en présence ou en absence de CSP. La culture est centrifugée 5 min à 5 000 g et le culot repris par 200  $\mu$ L de tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH=7.6, EDTA 1 mM) en présence de DNase/RNase 6  $\mu$ g/mL et d'inhibiteur de protéase CLAPA 1X (Chymostatine 1  $\mu$ g/mL, Pepstatine 1  $\mu$ g/mL, Leupeptine 1  $\mu$ g/mL, Antipain 1  $\mu$ g/mL, Aprotinine 4  $\mu$ g/mL). Les cellules sont lysées par l'appareil de sonication Sonifier 450 Branson® selon les paramètres suivants : 20 Coups / Puissance 30% / Efficacité 3, et deux fois 20 Coups / Puissance 40% / Efficacité 4. Les extraits sont dosés par la méthode de Bradford puis déposés sur gel SDS-PAGE (*S*odium *D*odecyl *S*ulfate – *P*oly*A*crylamid *G*el *E*lectrophoresis) à hauteur de 25  $\mu$ g.

#### 2. Dosage protéique par la méthode de Bradford

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Le réactif de Bradford, de couleur rouge, contient du Bleu de Coomassie qui interagit avec les acides-aminés basiques des protéines et donne une couleur bleue, absorbant à 595 nm. Une gamme étalon est établie avec des quantités de BSA connues afin de déterminer la concentration protéique.

### 3. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes SDS-PAGE

Les échantillons sont additionnés de Laemmli (Glycérol 10%, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 150 mM, Bleu de Bromophénol 0.01 % (m/v), Tris-HCl 0.6 mM pH=6.8) afin d'alourdir les échantillons, ainsi que de visualiser leur dépôt et leur migration (Laemmli, 1970). Le mélange chauffé 10 min à 95°C pour dénaturer les protéines, qui sont ensuite déposées sur un gel de polyacrylamide. Ce dernier est constitué d'acrylamide ponté par le bis-acrylamide en présence de catalyseurs, le TEMED (*N,N,N',N'-TetraMéthylEthylèneDiamine*) et l'APS (*Ammonium PerSulfate*), afin d'établir un tamis moléculaire pour séparer les molécules en fonction de leur taille. Le gel est composé de deux parties : le gel de concentration et le gel de séparation. Le gel de concentration constitue la partie supérieure du gel et permet, comme son nom l'indique, de concentrer les échantillons pour qu'ils arrivent tous au même moment au niveau du gel de séparation. Ce phénomène est nommé l'isotachophorèse, dont la propriété provient de la Glycine du tampon qui, à pH=6.8 du gel de concentration, est faiblement chargée négativement, et va donc migrer doucement et ainsi concentrer les échantillons. La quantité d'acrylamide/bis-acrylamide contenue dans le gel de séparation est fonction de la taille des molécules à séparer ; plus la concentration va augmenter, plus le maillage est étroit et permet de séparer plus finement des molécules. Dans cette étude, le gel de concentration possède un pourcentage d'acrylamide/bis-acrylamide de 4 % (Acrylamide/Bis-Acrylamide 4 % ratio 37.5/1 (v/v), Tris-HCl pH=6.8 0.125 mM, SDS 0.1 % (v/v), APS 0.04 % (v/v), TEMED 0.2 % (v/v)), et celui de séparation de 12.5 % (Acrylamide/Bis-Acrylamide 12.5 % ratio 37.5/1 (v/v), Tris-HCl pH=8.8 0.39 mM, SDS 0.1 % (v/v), APS 0.04 % (v/v), TEMED 0.2 % (v/v)). La migration est réalisée dans un tampon TG-SDS (Tris-HCl 25 mM, Glycine 0.192 M, SDS 0.1 % (v/v)) à 80 V jusqu'à l'interface entre les deux gels, puis à 180 V.

### 4. Coloration des gels SDS-PAGE au Bleu de Coomassie

Les protéines sur le gel peuvent être révélées par coloration au Bleu de Coomassie (Bleu de Coomassie 0.3 % (m/v), Ethanol 40 % (v/v), Acide acétique glacial 10 % (v/v)) qui réagit avec les acides-aminés basiques, pendant 20 min avec agitation. La révélation spécifique des

bandes d'intérêt se fait par une décoloration partielle du gel par une solution décolorante (Glycérol 1 % (v/v), Ethanol 30 % (v/v), Acide acétique glacial 10 % (v/v)).

## 5. Coloration des gels SDS-PAGE au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent est une autre méthode de détection des protéines sur SDS-PAGE et permet plus de sensibilité lors de la révélation. Le kit utilisé est « Pierce™ Silver Stain Kit » de Thermo Scientific®. Après deux lavages du gel dans de l'eau ultrapure, les protéines sont fixées deux fois pendant 15 min par une solution de fixation (Ethanol 30 %, Acide acétique glacial 10 %). Le gel est lavé deux fois 5 min dans de l'éthanol 10 %, puis dans de l'eau ultrapure. Le gel est sensibilisé pendant 1 min avec la solution de sensibilisation (1/500<sup>ème</sup> de « Sensitizer ») puis lavé 2 fois 1 min par de l'eau ultrapure. Le gel est ensuite coloré pendant 30 min par la solution de coloration (1/50<sup>ème</sup> de « Enhancer » dans la solution « Stain »), lavé deux fois 20 sec avec de l'eau ultrapure, et développé pendant 2-3 min par une solution de développement (1/50<sup>ème</sup> de « Enhancer » dans la solution « Developer ») jusqu'à apparition des bandes d'intérêt. La réaction est arrêtée par ajout d'acide acétique 5 % pendant 10 min.

## 6. Transfert des protéines sur membrane de PVDF et immunorévélation

Les protéines séparées sur SDS-PAGE sont transférées sur une membrane de PVDF (*PolyVinidylidene Fluorure*), préalablement activée dans du méthanol 100 %, pendant 30 min à 100 mA dans du tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM pH=8, Glycine 0.192 M, méthanol 20 % (v/v) et SDS 0.04 % (v/v)). La membrane est ensuite lavée par du PBS (*Phosphate Buffer Saline*) ou du TBST (*Tris Buffer Saline Tween*) (Tris-HCl 100 mM pH=8, NaCl 150 mM, Tween 0.05%), puis incubée pendant 1 h avec le tampon de blocage, qui varie en fonction de l'anticorps primaire utilisé (Tableau 7). Après un lavage de 10 min avec du tampon adéquat, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire pendant 1 h sous agitation douce, puis lavée trois fois 10 min avant d'être incubée avec l'anticorps secondaire pendant 1 h sous agitation. Enfin, la membrane est lavée trois fois 10 min puis révélée avec le kit « SuperSignal

West Pico Chemluminescent Substrate » de Thermo Scientific® et les images acquises par la caméra Fusion de Vilber-Lourmat®.

Anticorps primaire	Blocage	Conditions d'incubation	Anticorps secondaire	Référence
<b><math>\alpha</math>-GFP</b>	5 % BSA, TBST	1/10 000 <sup>ème</sup> , BSA 1 %, TBST	GAR 1/5 000 <sup>ème</sup> , BSA 1 %, TBST	AMS Biotechnology®
<b><math>\alpha</math>-Enolase</b>	5 % BSA, TBST	1/250 000 <sup>ème</sup> , BSA 1 %, TBST	GAR 1/5 000 <sup>ème</sup> , BSA 1 %, TBST	(Fleurie et al., 2012)
<b><math>\alpha</math>-pY (4G10)</b>	5 % BSA, TBST	1/2 000 <sup>ème</sup> , BSA 1 %, TBST	GAM 1/5 000 <sup>ème</sup> , BSA 1 %, TBST	Merck®
<b><math>\alpha</math>-pS/T</b>	5 % BSA, TBST	1/2 000 <sup>ème</sup> , BSA 1 %, TBST	GAR 1/5 000 <sup>ème</sup> , BSA 1 %, TBST	Invitrogen®
<b><math>\alpha</math>-flag</b>	3 % lait, PBS	1/1 000 <sup>ème</sup> , lait 3 %, PBS	GAM 1/5 000 <sup>ème</sup> , lait 3 %, PBS	Sigma®
<b><math>\alpha</math>-FtsZ</b>	5 % BSA, TBST	1/20 000 <sup>ème</sup> , BSA 1 %, TBST	GAR 1/5 000 <sup>ème</sup> , BSA 1 %, TBST	Covalab®

**Tableau 7 : Utilisation des anticorps.** Conditions d'immunorévélation des protéines avec un anticorps spécifique. GAR et GAM correspondent aux anticorps secondaires dirigés contre le lapin (*Rabbit*) et la souris (*Mouse*) respectivement, couplés à la HRP (*HorseRadish Peroxidase*) de Biorad®.

## 7. Purification des protéines possédant une étiquette 6-His

Une préculture d'*E. coli* BL21 (DE3), adaptée à la surproduction de protéines, contenant le plasmide d'intérêt, permet d'ensemencer une culture de 200 mL de LB avec l'antibiotique adéquat. La culture est incubée à 37°C sous agitation jusqu'à  $DO_{600nm}=0.5$ , et incubée pendant 3 h dans les mêmes conditions en présence d'IPTG 0.5 mM (*IsoproPyl- $\beta$ -D-ThioGalactopyranoside*). La culture est centrifugée 10 min à 5 000 g 4°C et le culot repris par 5 mL de tampon A (Tris-HCl 50 mM pH=7,5, NaCl 300 mM, imidazole 10 mM, glycérol 10%). Les cellules sont incubées 15 min à 4°C en présence de lysozyme 1  $\mu$ g/mL, de DNase/RNase 6  $\mu$ g/mL et d'inhibiteurs de protéase CLAPA 1X puis sont lysées par sonication (20 coups / Puissance 30 % / Efficacité 3 et deux fois 20 Coups / Puissance 40% / Efficacité 4, Sonifier 450 Branson®). Les débris cellulaires sont culottés par centrifugation 10 min à 14 000 g 4°C et les protéines solubilisées dans le surnageant mises en contact avec 200  $\mu$ L de résine Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose (Quiagen®), préalablement équilibrée dans le Tampon A, pendant 1 h sur roue à 4°C. Le mélange est centrifugé 5 min à 500 g et lavé trois fois avec 10 mL de tampon B (Tris-HCl 50 mM pH=7,5, NaCl 300 mM, imidazole 20 mM, glycérol 10%) afin d'éliminer les protéines non retenues. La protéine d'intérêt est éluée dans un tampon d'éluion (Tris-HCl 50 mM pH=7,5,

NaCl 300 mM, imidazole 150 mM, glycérol 10%) contenant une concentration plus élevée d'imidazole qui va entrer en compétition avec les protéines fixées à la résine et ainsi les éluer. Les différentes fractions sont analysées sur gel SDS-PAGE, dosées par la méthode de Bradford et dialysées (Spectra®/Por Dialysis avec une membrane possédant un seuil de coupure entre 6 à 8 kDa) une nuit à 4°C sous agitation douce dans un tampon de dialyse (Tris-HCl 50 mM pH=7,5, NaCl 300 mM, DTT (*DitThioThréitol*) 1 mM (m/v), MgCl<sub>2</sub> 1 mM (v/v), glycérol 10%). Pour les échantillons analysés en thermophorèse, le Tris-HCl contenu dans le tampon de dialyse est substitué par de l'HEPES 20 mM afin d'éviter la présence de phosphate lors du marquage. Les échantillons sont stockés à -80°C.

## 8. Tests de phosphorylation *in vitro*

Les protéines purifiées testées sont contrôlées par DLS (*Dynamic Light Scattering*) afin de confirmer leur intégrité, et la quantité évaluée par la méthode de Bradford. Elles sont incubées à raison de 4 µg de protéine-kinase et une quantité variable de protéine-substrat dans un rapport molaire 1:1 ou 5:1 (substrat:kinase) dans un tampon contenant du MgCl<sub>2</sub> pour l'activité kinase (Tris-HCl 25 mM pH=7,5, DTT 1 mM (m/v), MgCl<sub>2</sub> 5 mM (v/v), EDTA 1 mM) et 1 mM d'ATP. Le mélange est incubé pendant 30 min à 37°C, puis additionné de Laemmli et migre sur un gel SDS-PAGE. Après transfert sur une membrane de PVDF, les résidus phosphorylés sont révélés avec un anticorps anti-phosphotyrosine 4G10 (Merck®) ou anti-phosphosérine/thréonine (Invitrogen®).

## 9. Tests de phosphorylation *in vitro* avec de l'ATP radioactif

Les protéines purifiées testées sont contrôlées par DLS (*Dynamic Light Scattering*) afin de confirmer leur intégrité, et la quantité évaluée par la méthode de Bradford. Elles sont incubées à raison de 4 µg de protéine-kinase et une quantité variable de protéine-substrat dans un rapport molaire 1:1 ou 5:1 (substrat:kinase) dans un tampon contenant du MgCl<sub>2</sub> pour l'activité kinase (Tris-HCl 25 mM pH=7,5, DTT 1 mM (m/v), MgCl<sub>2</sub> 5 mM (v/v), EDTA 1 mM) et 1 mM de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP (5 µCi). Le mélange est incubé pendant 30 min à 37°C, puis additionné

de Laemmli et migre sur un gel SDS-PAGE. Le signal de radioactivité témoignant d'un transfert de phosphate est ensuite révélé par autoradiographie.

## 10. Co-immunoprécipitation

Les souches de *S. pneumoniae* sont ensemencées dans 500 mL de THY et cultivées à 37°C jusqu'à  $DO_{550nm}=0.3$ , puis centrifugées 10 min à 5 000 g 4°C. Le culot est repris par 1/20<sup>ème</sup> du volume de culture, soit 25 mL, de tampon protoplaste (Tris-HCl 0.1 M pH=7,5, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, sucrose 1 M, DNase/RNase 6 µg/mL, inhibiteur de protéase CLAPA 1X) et incubé 15 min à 30°C puis centrifugé 10 min à 5000 g. Cette étape est réalisée deux fois, puis le culot est repris par 2 mL de ce même tampon additionné de 400 U de mutanolysine et de 8 mg/mL de lysozyme, incubé 15 min à température ambiante, puis centrifugé 5 min à 5 000 g. Le culot est resuspendu par 2 mL de tampon hypotonique froid (Tris-HCl 0.1 M pH=7,5, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, digitonine 5% (m/v), mutanolysine 8 U/mL, lysozyme 8 mg/mL, inhibiteur de protéase CLAPA 1X, DNase/RNase 6 µg/mL, inhibiteur de phosphatase 1/100<sup>ème</sup> « Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 » de Sigma®) et incubé 30 min à 37°C puis centrifugé 5 min à 5 000 g 4°C afin d'éliminer les cellules non lysées. Le surnageant est recueilli et centrifugé 30 min à 14 000 g 4°C pour récupérer les protéines solubilisées et les incubé avec 50 µL de résine « GFP-Trap » de Chromotek® préalablement équilibrée par le tampon de lavage (Tris-HCl 10 mM pH=7.5, EDTA 0.5 mM, NaCl 150 mM, inhibiteur de protéase CLAPA 1X) sur une roue à 4°C pendant 2 h. La résine est lavée trois fois successivement par 1 mL de tampon de lavage additionné de digitonine 0.5 % (m/v) et centrifugé 2 min à 2 700 g 4°C. Les protéines sont éluées par ajout de Laemmli concentré deux fois et chauffé 10 min à 95°C avant dépôt sur gel de SDS-PAGE.

Pour les co-immunoprécipitations impliquant l'étiquette flag, la résine consiste en 200 µL de billes magnétiques (Dynabeads Invitrogen®) couplées à 20 µg d'anticorps anti-flag (Sigma®) dilués dans 200 µL de PBST. Le protocole est le même mais les centrifugations sont substituées par l'utilisation d'un portoir magnétique qui attire les billes au fond du tube.

## 11. Préparation de peptidoglycane de *S. pneumoniae*

Les souches de *S. pneumoniae* sont cultivées dans 1 L de THY jusqu'à  $DO_{550nm}=0.8$ . La culture est refroidie dans la glace pour arrêter la croissance et éviter l'action des autolysines, puis centrifugée 10 min à 7 000 g 4°C. Le culot est repris par 20 mL de Tris-HCl 50 mM pH=7 froid. Ce mélange est ajouté goutte à goutte dans une solution de SDS 8 % à 100°C, puis maintenu à température pendant 30 min afin d'éliminer les enzymes de dégradation du peptidoglycane. Une fois le mélange revenu à température ambiante, des centrifugations successives sont réalisées afin d'éliminer le SDS. Ainsi, une première centrifugation est réalisée 30 min à 14 000 g à température ambiante, puis trois autres après resuspension avec du NaCl 1 M. De la même manière, huit étapes de lavages sont réalisées avec de l'eau ultrapure, puis deux autres avec du NaCl 2M. Le culot est ensuite repris dans 5 mL d'eau ultrapure, et l'enveloppe de peptidoglycane cassée par agitation mécanique de billes de verre (Glass Beads diameter 0.1 mm Fastprep, Nextadvance®) par le Mini Beadbeater-8 de Biospec® products avec deux cycles de 30 sec et un cycle de 1 min à la puissance maximum. Après décantation, le surnageant est récupéré et centrifugé 15 min à 16 000 g et le culot est repris par 10 mL de tampon (Tris-HCl 100 mM pH=7.5, MgSO<sub>4</sub> 20 mM, DNase 10 µg/mL, RNase 50 µg/mL), puis incubé 2h45 à 37°C. Du CaCl<sub>2</sub> 10 mM et de la trypsine 100 µg/mL sont ajoutés au mélange, puis incubé 18 h à 37°C. Afin d'inactiver les enzymes, 1 % de SDS est ajouté et le mélange est incubé 15 min à 80°C puis centrifugé 30 min à 20 000 g. Les composés liés par interaction ionique sont éliminés par ajout successif de 10 mL de LiCl 8 M incubé 15 min à 37°C suivi d'une centrifugation 30 min à 20 000 g puis par 10 mL d'EDTA 100 mM pH=7 et de nouveau incubé 15 min à 37°C et centrifugé 30 min à 20 000 g. Le culot est repris par 10 mL d'eau ultrapure, centrifugé 30 min à 20 000 g, déshydraté par 1 mL d'acétone puis lavé avec 1 mL d'eau ultrapure. L'échantillon est de nouveau centrifugé 30 min à 20 000 g et repris dans 1 mL d'eau ultrapure, puis stocké à -80°C. La préparation de peptidoglycane est lyophilisée par l'appareil Alpha 1-2 LDplus de Christ® avant d'être analysé par spectrométrie de masse.

## IV. Techniques de microscopie

### 1. Microscopie optique à contraste de phase et à fluorescence

Les souches de *S. pneumoniae* sont cultivées dans du milieu C+Y jusqu'à la  $DO_{550nm}=0.3$ , puis centrifugées 3 min à 5 000 g, et le culot repris dans 100  $\mu$ L de milieu. Pour les tests d'induction en compétence, les cellules poussent jusqu'à  $DO_{550nm}=0.1$  dans du milieu C+Y pH=6.8, sont centrifugées 3 min à 5 000 g et reprises dans 1/100<sup>ème</sup> du volume de culture de milieu C+Y pH=7.8. Les cellules sont incubées avec du CSP 1X pendant différentes durées à 37°C et centrifugées avant observation. Dans le cas de l'observation de la substitution de *ftsZ-stop-gfp* par *ftsZ-gfp*, les cellules sont reprises dans 1/100<sup>ème</sup> du volume initiale avec du milieu C+Y pH=7.8 et du CSP 1X, et sont incubées avec 10 ng d'ADN (*ftsZ-gfp*) pendant 45 min, puis centrifugées avant observation. Pour les expériences de complémentation avec la plateforme  $P_{comX}$ , les cellules sont incubées avec 2  $\mu$ M de ComS dès le début de la culture, qui va induire l'expression de ComR, et consécutivement du gène sous le contrôle de  $P_{comX}$  (Berg et al., 2011). 1  $\mu$ L des cellules concentrées sont déposées sur un bloc de C+Y agarose 1.5% (m/v) entre lame et lamelle. La croissance des cellules est éventuellement suivie dans une chambre thermostatée à 37°C en prenant des photos à intervalles réguliers. Les cellules sont imagées au microscope Nikon TiE<sup>®</sup> avec un objectif 100x1.45, couplé à une caméra ORCA-Flash4.0 V2 Digital CMOS (Hamamatsu Photonics<sup>®</sup>). Les images sont acquises avec le logiciel NIS-Elements de Nikon<sup>®</sup> et analysées par le logiciel ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) et le plugin MicrobeJ pour déterminer les paramètres cellulaires tels que la longueur et la largeur, et les résultats liés à la fluorescence comme l'intensité corrigée et les cartes de chaleur (Ducret et al., 2016).

### 2. Marquage des sites d'insertion du peptidoglycane au TDL (TAMRA-D-Lysine)

Les souches de *S. pneumoniae* sont cultivées dans 15 mL de milieu C+Y jusqu'à atteindre la  $DO_{550nm}=0.2$ . 1 mL de culture est prélevé et incubé avec 0.01  $\mu$ M de TDL pendant 45 min à 37°C. Trois lavages au C+Y 4°C sont réalisés en centrifugeant les cellules 3 min à 5 000 g. Le culot est repris dans 100  $\mu$ L de milieu C+Y pour observation.



### 3. Microscopie électronique à balayage SEM (*Scanning Electron Microscopy*)

Les souches de *S. pneumoniae* sont cultivées dans 50 mL de milieu THY jusqu'à atteindre la  $DO_{550nm}=0.1$ , puis centrifugées 5 min à 5 000 g. Le culot est repris par 1 mL de PBS et déposé sur des lamelles de verre de 12 mm préalablement incubées avec une solution de polylysine 0.1 mg/mL pendant 1 h puis lavées deux fois au PBS, et séchées. Les cellules sédimentent sur ces lamelles pendant 10 min à 4°C, puis les lamelles sont lavées trois fois par 2 mL de cacodylate 0.18 M pH=7.6. Toutes les étapes ultérieures sont réalisées à 4°C. Les cellules sédimentées sur les lamelles sont ensuite fixées par 2 mL d'agent fixateur (glutaraldéhyde 2%, cacodylate 0.18M pH=7.6), puis lavées trois fois 10 min par 2 mL de cacodylate 0.18 M pH=7.6. Les cellules sont déshydratées dans des bains successifs d'alcool à concentration croissante pendant 10 min (Ethanol 30%, 50%, 70%, 95% et 100%). Trois bains de 10 min avec 2 mL de HMDS (*1,1,1,3,3,3-HexaMéthylDiSilazane*) sont réalisés afin de préserver la tension de surface des bactéries avant séchage des lamelles, qui sont fixées à un porte-objet par un vernis d'argent (Silver Conductive Adhesive 503, Electron Microscopy Sciences®). Les échantillons sont ensuite recouverts d'une fine couche d'or/platine (10 nm) (MED20, Baltec®) et observés au microscope électronique à balayage Quanta 250 FEG (FEI) au Centre des Microstructures à Villeurbanne.

### 4. Microscopie électronique à transmission (*Transmission Electron Microscopy*)

Les souches de *S. pneumoniae* sont cultivées dans 100 mL de milieu THY jusqu'à  $DO_{550nm}=0.1$ , puis centrifugées 10 min à 500 g. Le culot est lavé avec 1 mL de cacodylate 0.1 M pH=7.4, resuspendu avec 1 mL de liquide fixateur (glutaraldéhyde 5 %, cacodylate 0.1 M pH=7.4), et incubé sur la nuit à 4°C. L'échantillon est centrifugé 10 min à 500 g et repris avec 50 µL de cacodylate 0.1 M pH=7.4 préchauffé à 37°C, puis additionné de 100 µL d'agarose 2 % (m/v) dissous dans du cacodylate 0.1 M pH=7.4. Le mélange est rapidement déposé sur une lame et recouvert de cacodylate 0.1 M pH=7.4 afin de former une goutte semi-solide de bactéries piégées dans l'agarose. De petits cubes de 1 mm sont découpés et lavés trois fois avec 2 mL de cacodylate 0.1 M pH=7.4, incubés 1 h dans un tampon d'après fixation pour

stabiliser la structure macromoléculaire des lipides (tetroxide d'osmium 1%, cacodylate 0.1 M pH=7.4), puis lavés avec 2 mL d'eau ultrapure. Les cellules sont déshydratées à 4°C dans des bains successifs d'alcool à concentration croissante pendant 30 min (Ethanol 30%, 50%, 70%, 95% et 100%), avec trois bains de 30 min dans l'éthanol 100 %, puis 1 h dans un mélange résineux Ethanol:LR white (ratio 1:1) et enfin une nuit selon un ratio 1:2. Trois bains de LR white sont réalisés à 4°C pendant 2h30, et un sur la nuit. Les cubes sont finalement placés dans des capsules contenant du LR white et incubés à 60°C pendant 48 h. Les blocs sont ensuite découpés très finement (100 nm) au microtome, et les coupes déposées sur des grilles adaptées. Les échantillons sont contrastés à l'acétate d'uranyle 7% à saturation dans du méthanol pendant 10 min, puis au citrate de plomb (nitrate de plomb 77 µg/mL, citrate de sodium 58 µg/mL) et lavés par de la soude 0.02 M puis trois fois dans de l'eau ultrapure. Après séchage, les échantillons sont observés au microscope électronique Philips CM120 au Centre des Microstructures à Villeurbanne.

## V. Techniques de biophysique

### 1. Diffusion dynamique de la lumière DLS

Cette méthode permet d'estimer la taille d'une molécule (entre 1 et 500 nm) en solution par spectroscopie. Les molécules en suspension sont soumises au mouvement Brownien et diffusent la lumière de manière aléatoire dans toutes les directions. Plus une particule est grosse, moins elle aura de mobilité et donc l'intensité de lumière diffusée en fonction du temps sera moins importante. La différence d'intensité de lumière diffusée et le traitement mathématique reliant la mobilité à la taille (en se basant sur une protéine « modèle » sphérique) permettent d'estimer si la protéine forme des agrégats et traduisent donc sa stabilité dans un tampon. Trois essais de l'intensité en fonction du diamètre sont déterminés pour 200 µL d'échantillon à 25°C par l'appareil Zetasizer Nanoserie (Malvern Instruments®).

## 2. Thermophorèse à micro-échelle MST (MicroScale Thermophoresis)

La thermophorèse permet de caractériser de manière quantitative une interaction entre deux protéines grâce à la modification de propriétés (taille, charge ou hydratation) du complexe par rapport à la protéine cible seule. Lors d'une interaction, la mobilité du complexe soumis à un gradient de température sera différente de la molécule seule. En effet, une variation de température localisée conduit à une diffusion des molécules chauffées vers les zones les plus froides, dépendante de l'interface solvant/molécule, ce qui va diminuer la concentration globale des molécules. Une des protéines sera marquée par une sonde fluorescente afin de visualiser son profil en thermophorèse. La protéine cible est marquée par le kit « RED-NHS » de Nanotemper®, qui interagit de manière covalente avec les amines primaires des acides-aminés basiques. 60  $\mu\text{M}$  de colorant sont repris dans du DMSO, additionnés de 20  $\mu\text{M}$  de protéine, et incubés 30 min à l'abri de la lumière. Une chromatographie d'exclusion permet de récupérer la protéine marquée qui est ensuite dosée au « Nanodrop 2000 spectrophotometer » de Thermo Scientific®, en se basant sur la détection des acides-aminés aromatiques de la protéine à 280 nm. La fluorescence de la molécule est ensuite évaluée sur l'appareil « Monolith NT.115 MicroScale Thermophoresis » de Nanotemper®, ce qui se traduit par une courbe MST de l'intensité de fluorescence en fonction du temps. Le laser infrarouge crée un micro-gradient de température de l'échantillon présent dans des capillaires, et disperse les molécules d'eau, induisant une diminution de la fluorescence. La protéine cible marquée est ensuite incubée avec différentes concentrations de ligand afin de visualiser une éventuelle interaction, traduite par un profil MST différent. Si le ratio signal/bruit est suffisant, généralement supérieur à 5, pour conclure à une interaction, la constante de dissociation  $K_d$  est déterminée, et traduit la force de l'affinité entre les deux protéines.

### 3. Analyse des protéines purifiées par spectrométrie de masse en tandem couplée à une chromatographie liquide (LC-MS<sup>2</sup> : *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*)

Après purification des protéines directement chez le pneumocoque par co-immunoprécipitation et migration sur gel SDS-PAGE, la protéine d'intérêt est découpée sur gel, et digérée à la trypsine qui clive après les acides-aminés basiques Lysine et Arginine. Le mélange de peptide est ensuite dessalé en utilisant des colonnes « C18 Stage Tips » de Thermo Scientific®. Les peptides sont analysés par le système Proxeon Easy-LC (Biosystèmes Proxeon®) couplé au spectromètre de masse LTD-Orbitrap-Elite (Thermo Scientific®) équipé avec une source d'ions nanoelectrospray (Biosystèmes Proxeon®). Les peptides ionisés sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge et analysés par le logiciel MaxQuant version 1.3.0.5. L'identification des pics est réalisée par comparaison à des bases de données de protéines telles qu'Uniprot, afin d'identifier les protéines du pneumocoque retrouvées dans l'échantillon. La trypsine est définie comme une protéase et deux sites de clivage manquants sont autorisés. L'acétylation de l'extrémité N-terminale, l'oxydation de la Méthionine et la phosphorylation des Sérines, Thréonines et Tyrosines sont paramétrées comme des modifications variables au contraire de la carbamidométhylation de la Cystéine comme une modification fixe. La tolérance de masse initiale des précurseurs a été fixée à six parties par million ppm au niveau de l'ion précurseur et vingt ppm au niveau de l'ion fragment. Les spectres de peptides modifiés ont été validés manuellement.

## VI. Analyses bio-informatiques

### 1. Alignement de séquences

Les séquences nucléotidiques et protéiques sont alignées par l'outil BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) du serveur NPS@ (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>).

## 2. Prédiction de structures secondaires

Les structures secondaires des séquences protéiques issues d'Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) sont prédites avec le logiciel « topcons » (<https://topcons.cbr.su.se/>).

## 3. Modélisation de la structure d'AsnS de *S. pneumoniae* par homologie

Le modèle par homologie d'AsnS de *S. pneumoniae* a été réalisé en utilisant le logiciel Swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/>) qui a d'abord généré une librairie de modèle à partir de séquences et de structures similaires à AsnS. Un total de 637 modèles a été trouvé. Le candidat sélectionné pour l'établissement du modèle correspond à l'Asparaginyl-ARNt synthétase de *Pyrococcus horikoshii* (Code PDB : 1X54), qui possède un pourcentage d'identité de 43.85 % avec la séquence d'AsnS du pneumocoque. La structure d'AsnS de cet organisme a été résolue à une résolution de 1.45 Angstrom sous forme d'homodimère et couvre 96 % d'AsnS. Les modèles générés ont été validés par le Dr Stéphanie RAVAUD afin de n'en former qu'un qui a été ensuite traité par le logiciel Rasmol.

# Résultats



## I. L'autotyrosine-kinase UbK est nécessaire à la croissance et à la morphologie cellulaire de *S. pneumoniae*

Une étude phosphoprotéomique a mis en évidence une centaine de protéines phosphorylées sur la Sérine, la Thréonine et/ou la Tyrosine chez *S. pneumoniae* (Sun et al., 2010). A partir de là, il nous a semblé peu probable que les deux seules protéine-kinases StkP et CpsD du pneumocoque soient responsables de la phosphorylation de toutes ces protéines (Mercy et al., 2019; Nourikyan et al., 2015; Zucchini et al., 2017). Nous avons fait l'hypothèse que le pneumocoque produirait d'autres protéine-kinases encore non identifiées. Récemment, une nouvelle famille de protéine-kinases exclusivement bactérienne a été découverte et nommée UbK (pour *Ubiquitous Bacterial Kinase*). Les protéines UbK possèdent des caractéristiques différentes des autres familles de protéine-kinases (STPK et BYK) décrites à ce jour. Le premier membre de cette famille a été identifié chez *B. subtilis*, et est également présent chez le pneumocoque (Nguyen et al., 2017). Nous nous sommes donc intéressés au rôle biologique de la protéine UbK chez le pneumocoque.

Nous avons réalisé un mutant d'*ubk* directement sur le chromosome du pneumocoque. Cependant, la délétion du gène *ubk* n'est obtenue qu'au prix d'une très basse fréquence de transformation (environ 0.001%), ce qui est un indicateur probable de la co-occurrence d'une mutation suppressive. Nous avons identifié par séquençage du génome une mutation ponctuelle suppressive de la délétion d'*ubk* dans le gène *asnS* codant potentiellement pour une AsparaginyI-ARNt synthétase. La mutation (AsnS D121A) dans *asnS* est donc retrouvée systématiquement dans un mutant *ubk*. Nous avons ensuite généré une version d'UbK couplée à la GFP pour la purifier par immunoprécipitation. Nous avons ainsi validé l'autophosphorylation d'UbK sur la Tyrosine en utilisant un anticorps anti-phosphotyrosine. L'analyse par spectrométrie de masse de la protéine GFP-UbK a révélé une unique Tyrosine phosphorylée, la Tyrosine 58. Nous avons donc construit des souches mutantes de phosphorylation de cette enzyme : un mutant phosphablatif mimant une absence de phosphorylation (*ubk Y58F*), et un mutant phosphomimétique mimant une phosphorylation permanente (*ubk Y58E*). Ces mutants ne sont pas phosphorylés *in vivo*, démontrant effectivement que seule la Tyrosine 58 est autophosphorylée. Par ailleurs, nous avons voulu déterminer si l'autophosphorylation d'UbK est réalisée en *cis* ou en *trans*. Pour



cela, nous avons construit un mutant catalytique d'UbK, au sein duquel la Lysine conservée du domaine Walker A, impliquée dans la fixation de l'ATP, est mutée en Arginine (*ubk K36R*). Nous avons alors incubé une forme sauvage d'UbK avec un mutant catalytique UbK K36R, purifiés chez *E. coli*, en présence de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-ATP radioactif. Seul UbK a montré un signal d'autophosphorylation par autoradiographie, contrairement à la forme UbK K36R. Ce résultat démontre que l'activité d'hydrolyse de l'ATP est nécessaire pour l'autophosphorylation en *cis*, alors qu'UbK est incapable de phosphoryler UbK K36R par *trans*-phosphorylation.

Par la suite, nous avons évalué l'effet de l'absence d'*ubk* sur la biologie du pneumocoque. Nous avons observé qu'un mutant  $\Delta$ *ubk* montrait une croissance altérée, avec des temps de latence et de génération plus longs que pour la souche sauvage, ainsi qu'une lyse moins rapide. Ces défauts de croissance ne sont cependant pas le fait de la mutation suppressive, puisqu'ils ne sont pas observés en présence de la mutation suppressive seule dans le génome d'une souche de *S. pneumoniae*.

Nous avons également étudié l'effet de la phosphorylation sur la croissance du pneumocoque. Le mutant catalytique UbK K36R présente une croissance similaire à celle du mutant  $\Delta$ *ubk*, soulignant le caractère primordial de l'hydrolyse de l'ATP par UbK. De manière surprenante, le mutant phosphomimétique UbK Y58E montre également les mêmes défauts de croissance, contrairement au mutant phosphoablatif UbK Y58F. Ce résultat suggère que la phosphorylation permanente d'UbK est délétère pour la bactérie, qui présente une croissance altérée. De la même manière, l'activité d'hydrolyse de l'ATP d'UbK est nécessaire pour la croissance du pneumocoque. Ainsi, l'autophosphorylation d'UbK semble contrôler son activité d'hydrolyse de l'ATP. La création d'un double mutant UbK Y58F-K36R montre un profil affecté en croissance, alors qu'il ne l'était pas en présence d'UbK Y58F seul. Ce résultat nous indique que l'activité d'hydrolyse de l'ATP d'UbK prévaut sur la phosphorylation dans son rôle sur la croissance du pneumocoque. L'autophosphorylation d'UbK pourrait donc jouer un rôle de modulation de son activité d'hydrolyse de l'ATP.

Pour évaluer cette hypothèse, nous avons mesuré l'activité d'hydrolyse de l'ATP *in vitro* des mutants d'UbK produits chez *E. coli*. UbK présente une faible activité d'hydrolyse de l'ATP, comme son homologue de *B. subtilis* (Nguyen et al., 2017). L'activité d'hydrolyse de l'ATP est fortement réduite, comme attendu, chez le mutant catalytique UbK K36R. De manière intéressante, le mutant phosphoablatif UbK Y58F présente une activité d'hydrolyse

de l'ATP plus faible que la forme sauvage d'Ubk. A l'inverse le mutant phosphomimétique UbK Y58E montre une activité augmentée. L'analyse de l'autoradiographie d'Ubk purifiée chez *E. coli* en présence d'ATP radioactif montre une augmentation du signal d'autophosphorylation en fonction du temps. Ce signal diminue lorsque l'on ajoute de l'ATP froid, qui rentre en compétition avec l'ATP radioactif. Ce résultat traduit que les sites d'autophosphorylation d'Ubk ne sont pas saturés, et qu'il existe donc un mélange des formes phosphorylées et non phosphorylées d'Ubk lorsqu'elle est produite chez *E. coli*. La différence d'hydrolyse de l'ATP entre une forme mimant une phosphorylation permanente d'Ubk (mutant UbK Y58E) et une forme mimant une absence de phosphorylation (UbK Y58F) montre que l'absence de phosphorylation est partiellement délétère pour la capacité d'hydrolyse de l'ATP par l'enzyme. L'autophosphorylation d'Ubk influence donc bien la capacité d'hydrolyse de l'ATP.

Les défauts de croissance des mutants d'*ubk* nous ont conduit à analyser la morphologie des mutants d'Ubk par microscopie à contraste de phase. Ces analyses ont démontré que les mutants d'Ubk incapables d'hydrolyser l'ATP à des niveaux WT ( $\Delta ubk$ , UbK K36R et Y58E) présentent des cellules de forme anormale et globalement plus larges. Ces défauts suggèrent des modifications de la paroi cellulaire, qui contribue à la forme ovococcale de *S. pneumoniae*. Nous avons observé par microscopie électronique à transmission et à balayage que ces cellules possèdent une paroi défectueuse, avec des cassures et ce que l'on peut apparenter à de l'écaillage, ainsi que de multiples septa mal positionnés. L'hydrolyse de l'ATP et un niveau contrôlé d'autophosphorylation sont donc essentiels à la morphogénèse du pneumocoque. La majeure partie des protéines impliquées dans le contrôle de la division est localisée au septum où a lieu la synthèse de peptidoglycane. Nous nous sommes donc intéressés à la localisation cellulaire d'Ubk en la fusionnant à la GFP. Les différentes formes d'Ubk s'avèrent toutes cytoplasmiques, suggérant que le rôle d'Ubk dans la morphogénèse n'est pas exclusivement connecté à la modulation de l'activité des protéines présentes au sein du divisome.

L'ensemble de ces résultats nous a conduit à proposer un modèle selon lequel la phosphorylation d'Ubk contrôle sa capacité d'hydrolyse de l'ATP, qui est essentielle à la croissance et la morphogénèse cellulaire du pneumocoque. L'absence d'hydrolyse de l'ATP et/ou une phosphorylation permanente sont donc délétères pour la cellule. Ceci implique une

régulation fine du niveau de phosphorylation d'UbK, potentiellement dépendante de l'action d'une phosphatase encore non identifiée.



# The Tyrosine-Autokinase UbK Is Required for Proper Cell Growth and Cell Morphology of *Streptococcus pneumoniae*

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Hari S. Misra,  
Bhabha Atomic Research Centre  
(BARC), India

### Reviewed by:

Linda Doubravová,  
Institute of Microbiology (ASCR),  
Czechia  
David Engelberg,  
The Hebrew University of Jerusalem,  
Israel

### \*Correspondence:

Christophe Grangeasse  
christophe.grangeasse@bcf.fr  
Sébastien Guiral  
sebastien.guiral@bcf.fr

### † Present address:

Clément Gallay,  
Department of Fundamental  
Microbiology, Faculty of Biology  
and Medicine, University of Lausanne,  
Lausanne, Switzerland  
Jennyfer Trouve,  
Groupe Pneumocoque, Institut  
de Biologie Structurale, Université  
Grenoble Alpes/CNRS/CEA,  
Grenoble, France

### Specialty section:

This article was submitted to  
Microbial Physiology and Metabolism,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

Received: 07 June 2019

Accepted: 07 August 2019

Published: 03 September 2019

### Citation:

Pelletier A, Freton C, Gallay C,  
Trouve J, Cluzel C, Franz-Wachtel M,  
Macek B, Jault J-M, Grangeasse C  
and Guiral S (2019) The  
Tyrosine-Autokinase UbK Is Required  
for Proper Cell Growth and Cell  
Morphology of *Streptococcus*  
*pneumoniae*.  
Front. Microbiol. 10:1942.  
doi: 10.3389/fmicb.2019.01942

Anaïs Pelletier<sup>1</sup>, Céline Freton<sup>1</sup>, Clément Gallay<sup>1†</sup>, Jennyfer Trouve<sup>1†</sup>, Caroline Cluzel<sup>2</sup>, Mirita Franz-Wachtel<sup>3</sup>, Boris Macek<sup>3</sup>, Jean-Michel Jault<sup>1</sup>, Christophe Grangeasse<sup>1\*</sup> and Sébastien Guiral<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Molecular Microbiology and Structural Biochemistry, UMR 5086 CNRS/Université Lyon 1, Lyon, France, <sup>2</sup> Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, UMR 5305 CNRS/Université Lyon 1, Lyon, France, <sup>3</sup> Proteome Center Tübingen, University of Tübingen, Tübingen, Germany

Protein phosphorylation is a key post-translational modification required for many cellular functions of the bacterial cell. Recently, we identified a new protein-kinase, named UbK, in *Bacillus subtilis* that belongs to a new family of protein-kinases widespread in bacteria. In this study, we analyze the function of UbK in *Streptococcus pneumoniae*. We show that UbK displays a tyrosine-kinase activity and autophosphorylates on a unique tyrosine *in vivo*. To get insights into its cellular role, we constructed a set of pneumococcal *ubk* mutants. Using conventional and electron microscopy, we show that the *ubk* deficient strain, as well as an *ubk* catalytic dead mutant, display both severe cell-growth and cell-morphology defects. The same defects are observed with a mutant mimicking permanent phosphorylation of UbK whereas they are not detected for a mutant mimicking defective autophosphorylation of UbK. Moreover, we find that UbK phosphorylation promotes its ability to hydrolyze ATP. These observations show that the hydrolysis of ATP by UbK serves not only for its autophosphorylation but also for a distinct purpose essential for the optimal cell growth and cell-morphogenesis of the pneumococcus. We thus propose a model in which the autophosphorylation/dephosphorylation of UbK regulates its cellular function through a negative feedback loop.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*, protein phosphorylation, tyrosine-kinase, ATP hydrolysis, cell-morphogenesis

## INTRODUCTION

*Streptococcus pneumoniae* (the pneumococcus) is a Gram-positive bacterium, living as a commensal in healthy adults and children. In immature and/or immunocompromised people, the pneumococcus can, however, become pathogenic and causes diseases that range from otitis, pneumonia to meningitis with sepsis (Kadioglu et al., 2008; Henriques-Normark and Normark, 2010). Despite the availability of antibiotic treatments and vaccines, *S. pneumoniae* still kills more than 1.2 million persons each year and is in the WHO list of priority pathogens for research and development of new antibiotics (Tacconelli, 2017).

Evidences have accumulated that protein phosphorylation on hydroxylated residues (i.e., serine, threonine and tyrosine) catalyzed by serine/threonine-kinases and tyrosine-kinases is crucial for the biology of bacteria (Manuse et al., 2016; Mijakovic et al., 2016). eSTKs (for eukaryotic-like Serine and Threonine kinases), that possess a catalytic domain structurally homologous to that of eukaryotic protein-kinases, have been shown to regulate different physiological processes like the cell cycle, virulence and central and secondary metabolisms (Burnside and Rajagopal, 2012; Mijakovic and Macek, 2012; Canova and Molle, 2014; Fleurie et al., 2014b; Wright and Ulijasz, 2014; Dworkin, 2015; Manuse et al., 2016). eSTKs are widespread in bacteria, but with a highly variable distribution (Dworkin, 2015). On the other hand, phosphorylation on tyrosine is mainly achieved by the bacterial idiosyncratic protein-tyrosine kinase family BY-kinases (Bacterial tyrosine kinases) (Grangeasse et al., 2007; Jadeau et al., 2008; Mijakovic et al., 2016). Like eSTKs, BY-kinases regulate several biological processes and their best studied function concerns their role in the biosynthesis and export of extracellular polysaccharides (Standish et al., 2014; Nourikyan et al., 2015; Mijakovic et al., 2016). They are also widely conserved in bacterial genomes and most of bacterial species encode for at least one BY-kinase (Jadeau et al., 2012).

In the pneumococcus, only one eSTK and one BY-kinase, StkP and D respectively, are produced. Recent studies have demonstrated the critical role of D in the polysaccharide capsule synthesis and export as well as the coordination of this process with the cell cycle (Henriques et al., 2011; Nourikyan et al., 2015; Mercy et al., 2019). The capsule is the main virulence factor of the pneumococcus and its composition is highly variable (more than 90 serotypes known to date). On the other hand, StkP is the central regulator of cell division and morphogenesis (Beilharz et al., 2012; Fleurie et al., 2012, 2014a,b; Grangeasse, 2016; Zucchini et al., 2018).

We have recently identified an unprecedented type of protein-kinase in *Bacillus subtilis* (Nguyen et al., 2017). This protein was named UbK for Ubiquitous bacterial Kinase as it is present in most bacterial genomes. Strikingly, *ubk* genes are found neither in *Archaea* nor in eukaryotic genomes (Teplyakov et al., 2002). UbK proteins possess the canonical Walker A-motif G/AX4GKT/S found in the large family of the P-loop proteins, including BY-kinases (Leipe et al., 2002; Grangeasse et al., 2007). However, besides this, the crystal structures of UbK from *Haemophilus influenzae* and *B. subtilis* showed that the structure of UbK proteins share little similarities with that of BY-kinases and other ATP-binding proteins with a Walker A motif (Reinstein et al., 1990; Nguyen et al., 2017). Interestingly, UbKs of *H. influenzae*, *E. coli* or *B. subtilis* show a weak ATPase activity (Campbell et al., 2007; Karst et al., 2009) but their ability to autophosphorylate and to phosphorylate *in vitro* the surrogate substrate Myelin-Basic-Protein has been reported only for UbK from *B. subtilis* (Nguyen et al., 2017). In *B. subtilis*, a recent investigation suggests a possible role in resistance to oxidative stress (Nguyen et al., 2017). *ubks* were described as being essential genes in *S. pneumoniae* (Zalacain et al., 2003; Havarstein et al., 2006), *B. subtilis* (Kobayashi et al., 2003), *Mycoplasma pulmonis*

(French et al., 2008) and *E. coli* (Freiberg et al., 2001; Campbell et al., 2007). On the other hand, other studies have concluded that *ubk* would be dispensable in *S. pneumoniae* (Molzen et al., 2011), *B. subtilis* (Hunt et al., 2006; Karst et al., 2009; Nguyen et al., 2017), and *Anabaena* sp. strain (Yoon et al., 2003). One can therefore not exclude that these opposing observations either convey the presence of suppressive mutations appearing when deleting *ubk* genes or that the dispensability/essentiality of *ubk* is strain-specific.

Here, we analyze the cellular function of the pneumococcal UbK (*spr1761* in the R6 strain) together with its kinase and ATP hydrolysis activities. We notably demonstrate that UbK ATP hydrolysis activity, but not autophosphorylation, is crucial for *S. pneumoniae* growth. However, we also show that UbK autophosphorylation increases ATP hydrolysis and is detrimental for the cell growth. Last, we observe that cell growth defects correlate with an abnormal cell morphology. Therefore, we propose a model in which autophosphorylation/dephosphorylation of UbK finely tunes and balances its ATP hydrolysis, an activity that is required for the optimal growth and proper morphogenesis of the pneumococcus cell growth. Altogether, this work highlights the importance of this new atypical tyrosine-kinase in the bacterial cell physiology.

## RESULTS

### *ubk* Is Essential for *Streptococcus pneumoniae*

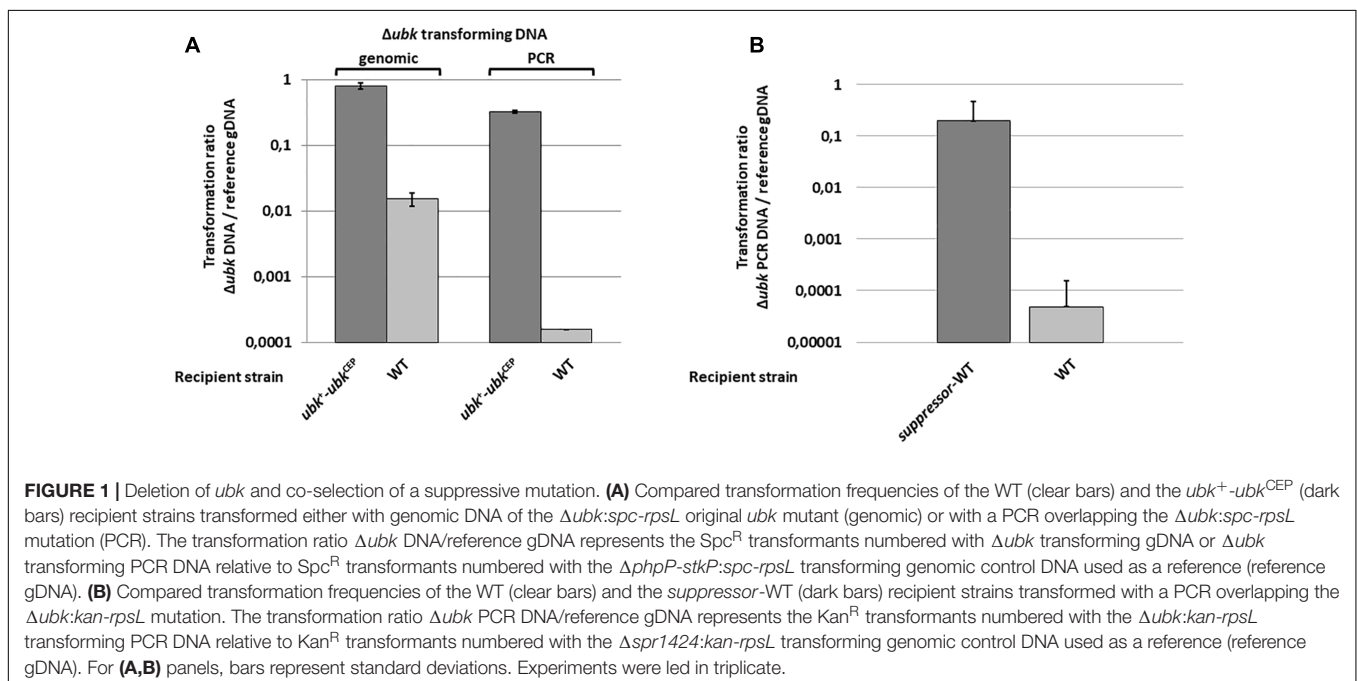
To delete *ubk*, we used the Janus markerless and non-polar strategy (Sung et al., 2001). While transformants of the R6 derivative strains were usually obtained after a 16-h culture with transformation levels ranging from 1 to 10%, small colonies of kanamycin resistant mutants were obtained with very low frequency (0.001%) after 30 h of growth. We confirmed that *ubk* was properly deleted and substituted for the Janus cassette ( $\Delta ubk:kan-rpsL$ ) in these mutant colonies by PCR amplification and sequencing of the targeted locus. This observation suggested that *ubk* was either crucial for the pneumococcus biology or that deletion of *ubk* generates a polar effect affecting the expression of downstream genes. To differentiate between the two possibilities, we first expressed *ubk* ectopically using the pCEP maltose-inducible platform (Guiral et al., 2006) in WT cells ( $ubk^+ -ubk^{CEP}$ ). Then, we substituted the chromosomal copy of *ubk* for the Janus cassette ( $\Delta ubk:kan-rpsL-ubk^{CEP}$ ). Colonies were readily obtained with normal growth and transformation frequency. This excluded the second hypothesis and suggested that the deletion of *ubk* requires suppressive mutations(s). To check this, we statistically analyzed the number of clones obtained by transformation of the WT and the  $ubk^+ -ubk^{CEP}$  strains either with a whole genomic DNA of a  $\Delta ubk:spc-rpsL$  mutant or with a  $\Delta ubk:spc-rpsL$  PCR amplified DNA fragment (Figure 1A). The  $ubk^+ -ubk^{CEP}$  strain transformed efficiently the two donor DNAs. By contrast, the WT strain transformed the genomic DNA with a 2 log decreased efficiency compared to the  $ubk^+ -ubk^{CEP}$  strain and transformed the PCR DNA with a 4 log decreased efficiency compared to the  $ubk^+ -ubk^{CEP}$

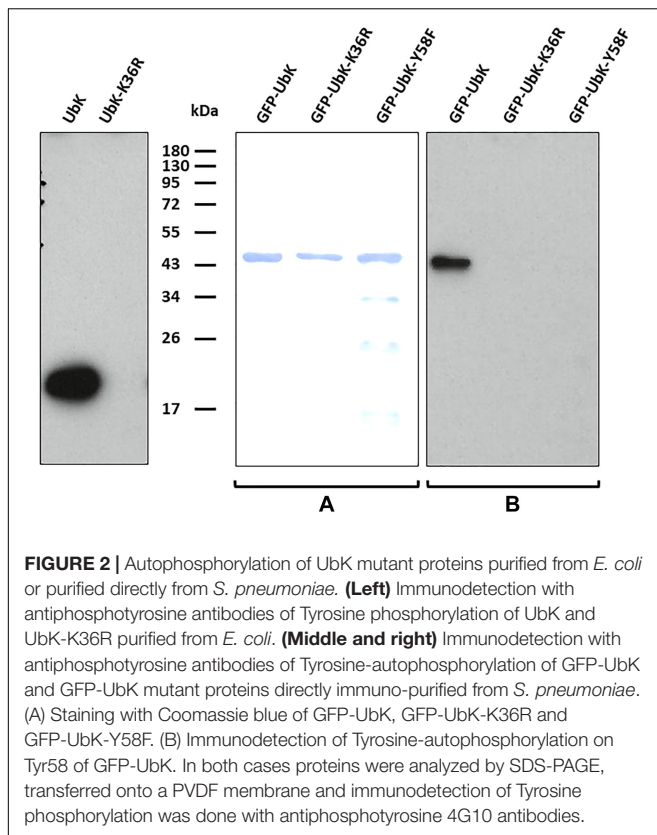
strain. This suggested the presence of a single suppressive mutation co-selected with *ubk* deletion in the genome of original mutants. To identify this suppressive mutation, we performed whole genome sequencing of two independent  $\Delta ubk$  mutants together with that of the WT parental strain. A single mutation differentiating the WT and the  $\Delta ubk$  mutant genomes was unambiguously identified. This mutation consisted in an A to C transversion in position 362 relative to the ATG of the *spr1397* (*asnS*) coding sequence. The mutation led to an aspartate to alanine amino-acid substitution in position 121 of the AsnS protein. *spr1397* was shown already to be an essential gene (Thanassi et al., 2002). We nevertheless transferred the D121A mutation in the *spr1397* gene of WT strain (*asnS-D121A*) and the resulting mutant, called suppressor-WT, was transformed again by the Janus cassette to inactivate chromosomal *ubk*. Colonies were readily obtained with normal transformation level and growth. Confirming that the single A362 to C362 transversion in the *asnS* gene is required to get cells devoid of *ubk* (Figure 1B).

## UbK Autophosphorylates on a Single Tyrosine Residue *in vivo*

UbK of *S. pneumoniae* was previously shown *in vitro* either able to autophosphorylate on tyrosine and to phosphorylate the surrogate substrate myelin basic protein (MBP) (Nguyen et al., 2017). We first tested the relevance of UbK autophosphorylation *in vivo*. For that, we purified UbK fused to the GFP (GFP-UbK) from pneumococcal cells (strain  $\Delta ubk$ -gfp-*ubk*<sup>CEP</sup>). As control, we also constructed a strain expressing a UbK kinase-dead form in which the conserved lysine 36 of the Walker A motif is mutated for an arginine (strain  $\Delta ubk$ -gfp-*ubk*K36R<sup>CEP</sup>). Indeed, mutation of this catalytic lysine

prevents ATP hydrolysis of Walker A ATP-binding proteins (Reinstein et al., 1990; Soulat et al., 2007; Karst et al., 2009). In addition, we checked that Ubk-K36R overexpressed and purified from *E. coli* cells is unable to autophosphorylate on tyrosine *in vitro* (Figure 2). The same observation was made previously with UbK (i.e., YdiB) from *B. subtilis* mutated on lysine 41 of the Walker A (Nguyen et al., 2017). We then prepared crude extracts of the  $\Delta ubk$ -gfp-*ubk*<sup>CEP</sup> and the  $\Delta ubk$ -gfp-*ubk*K36R<sup>CEP</sup> pneumococcal strains and performed GFP trap using GFP antibodies immobilized on agarose. Immunopurified proteins were then analyzed by SDS-PAGE and UbK phosphorylation was analyzed by Western blot using the 4G10 antiphosphotyrosine antibody. As shown in Figure 2, a phosphorylation signal was detected for GFP-UbK but not for GFP-UbK-K36R confirming that UbK is autophosphorylated on tyrosine *in vivo*. Then, we analyzed GFP-UbK by LC-MS/MS mass spectrometry. It showed unambiguously that GFP-UbK was phosphorylated on the tyrosine 58 (Supplementary Figure 1A). To confirm this, and check if Y58 represented the single autophosphorylation site of UbK, we constructed a strain expressing GFP-UbK in which Y58 was substituted for a phenylalanine (strain  $\Delta ubk$ -gfp-*ubk*Y58F<sup>CEP</sup>). Using the same procedure, GFP-UbK-Y58F was GFP-trapped and analyzed by SDS-PAGE and Western blot with the 4G10 antiphosphotyrosine antibody. No phosphorylation signal was detected (Figure 2). Then, we performed Western blots and immunodetections with the antiphosphotyrosine antibodies on whole-cells extracts of WT and  $\Delta ubk$  cells to determine if UbK is responsible for the phosphorylation of pneumococcal endogenous proteins *in vivo* (Supplementary Figure 1B). We did not detect phosphorylation signals in WT cells that are not found in  $\Delta ubk$  cells, suggesting that UbK is unable to phosphorylate a substrate, or only at very low levels undetectable by immunolabelling. The signal





detected around 40 kDa in both strains suggested that an unknown protein might be phosphorylated on tyrosine but independently of UbK. In addition, to determine whether UbK autophosphorylates in *cis* or *trans*, we incubated inactive UbK-K36R and UbK with radioactive [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-ATP. The difference in size of the tags fused to UbK-K36R and UbK (**Supplementary Table 1**) that were used for their purification allowed to separate the two proteins by SDS-PAGE. Autoradiography of the gel showed that UbK displayed a radioactive signal whereas UbK-K36R did not (**Supplementary Figure 1C**). This showed that UbK is unable to *trans*-phosphorylate UbK-K36R and that UbK only *cis*-autophosphorylates. UbK is therefore a tyrosine-autokinase *cis*-autophosphorylating on a single tyrosine, namely tyrosine 58.

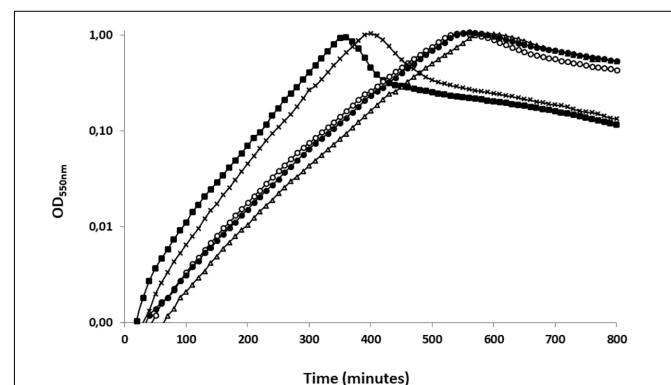
## ATP Hydrolysis by UbK but Not UbK Autophosphorylation Is Required for Cell Growth

To assess the function of UbK autophosphorylation, we first analyzed the growth of different *ubk* mutants. As control, we first checked that the suppressive mutation D121A has not effect on the pneumococcal growth (**Supplementary Figure 2**). Then, we generated strains expressing the different forms of UbK (mutated on the catalytic lysine and Y58) from the *ubk* chromosomal locus under the control of the native promoter. Two strains expressing UbK carrying either a mutation substituting Y58 for a phenylalanine or for a glutamic acid (strains *ubk*-Y58F

and *ubk*-Y58E respectively) were constructed. Indeed, mutation of a phosphorylatable tyrosine for a phenylalanine (phospho-ablative) or a glutamic acid (phospho-mimetic) is classically used as the best proxy to mimic a deficient or permanent phosphorylation, respectively (Bidnenko et al., 2013; Lee et al., 2014; Vilcheze et al., 2014). The mutated chromosomal copy represented therefore the only source of UbK protein in these mutant strains (*ubk*-K36R, *ubk*-Y58F, and *ubk*-Y58E). The analysis of the cell growth of these mutants revealed an unexpected behavior. While cells expressing UbK-K36R grew slowly and similarly to  $\Delta ubk$  cells, reflecting that UbK activity is crucial for the pneumococcal growth, *ubk*-Y58E cells also displayed the same slow and delayed growth (**Figure 3**). These observations implied that the ability of UbK to bind and hydrolyze ATP is not only dedicated to its autophosphorylation but likely serves another purpose required for the growth of the pneumococcus. On the other hand, it also suggested that permanent phosphorylation of UbK is detrimental for the cell. Supporting this, *ubk*-Y58F cell grew properly (**Figure 3**). Moreover, we constructed two other mutants in which we mutated both the catalytic lysine and the autophosphorylation site, generating thus the *ubk*-K36R-Y58F and the *ubk*-K36R-Y58E strains. We observed that these two strains behaved like the *ubk*-K36R and  $\Delta ubk$  mutants with a slow and delayed growth (**Supplementary Figure 3** and **Figure 3**). The *ubk*-K36R mutation is therefore epistatic over *ubk* phosphorylation and ATP hydrolysis is predominant for the cell growth. This indicates that the ability to bind and/or hydrolyze ATP is crucial for the pneumococcus and further suggests that UbK autophosphorylation could modulate ATP hydrolysis.

## The ATP Hydrolysis Activity of UbK Is Modulated by Autophosphorylation

To further check our hypothesis, we analyzed the ability of UbK mutant proteins to hydrolyze ATP. For that, we



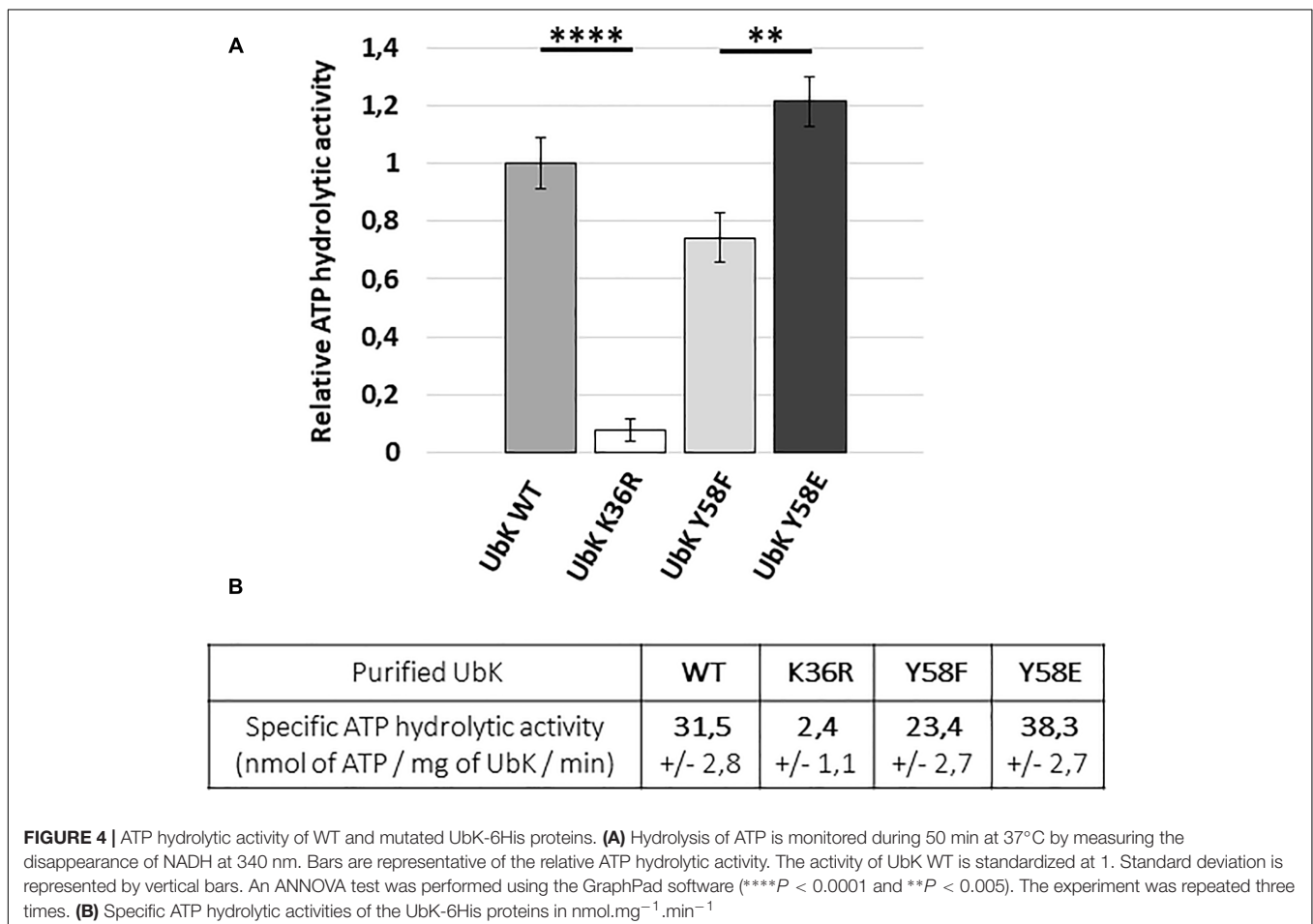
**FIGURE 3 |** Representative growth of *ubk* mutants. Growth curves of *ubk* mutants at 37°C: WT (black squares),  $\Delta ubk$  (white triangles), *ubk*-K36R (white circles), *ubk*-Y58E (black circles), *ubk*-Y58F (black crosses). Bacteria were diluted so that  $2 \cdot 10^5$  cells were added at  $t = 0$  min. *ubk*-Y58F strain grows like the WT strain whereas  $\Delta ubk$ , *ubk*-K36R and *ubk*-Y58E strains display an increased lag phase and a reduced generation time during the exponential growth phase. Growths were led in triplicate.

overproduced in *E. coli* and purified UbK mutants fused to a C-terminal 6His-tag (UbK-6His, UbK-K36R-6His, UbK-Y58F-6His and UbK-Y58E-6His) (**Supplementary Figure 4**). Then, we used the pyruvate-kinase/lactate-dehydrogenase assay to measure the ATP hydrolysis activity of UbK (Karst et al., 2009; Typas et al., 2011). As expected, the inactive UbK-K36R-6His protein was unable to hydrolyze ATP (**Figure 4A**). By contrast, and as previously reported for Ubk of *B. subtilis*, UbK-6His harbored a low ATP hydrolysis activity ( $31.5 \pm 2.8$  nanomoles of ATP/mg of UbK/min) (**Figure 4B**). We further observed a significant difference regarding the ability to hydrolyze ATP between UbK-Y58F-6His and UbK-Y58E-6His. Indeed, UbK-Y58F-6His displayed a reduced activity ( $23.4 \pm 2.7$  nanomoles of ATP/mg of UbK/min) compared to UbK-6His whereas UbK-Y58E-6His hydrolyzed ATP more efficiently than UbK-6His ( $38.3 \pm 2.7$  nanomoles of ATP/mg of UbK/min). UbK autophosphorylation therefore influences its ability to hydrolyze ATP. To strengthen this observation, we incubated purified UbK-6His with radiolabeled [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-ATP and varying concentrations of non-radioactive ATP for different times. We observed increasing radioactive phosphorylation signals for UbK as a function of the incubation time (**Supplementary Figure 5**). The same experiment performed in the presence of increasing concentrations of non-radioactive ATP, showed a decrease of

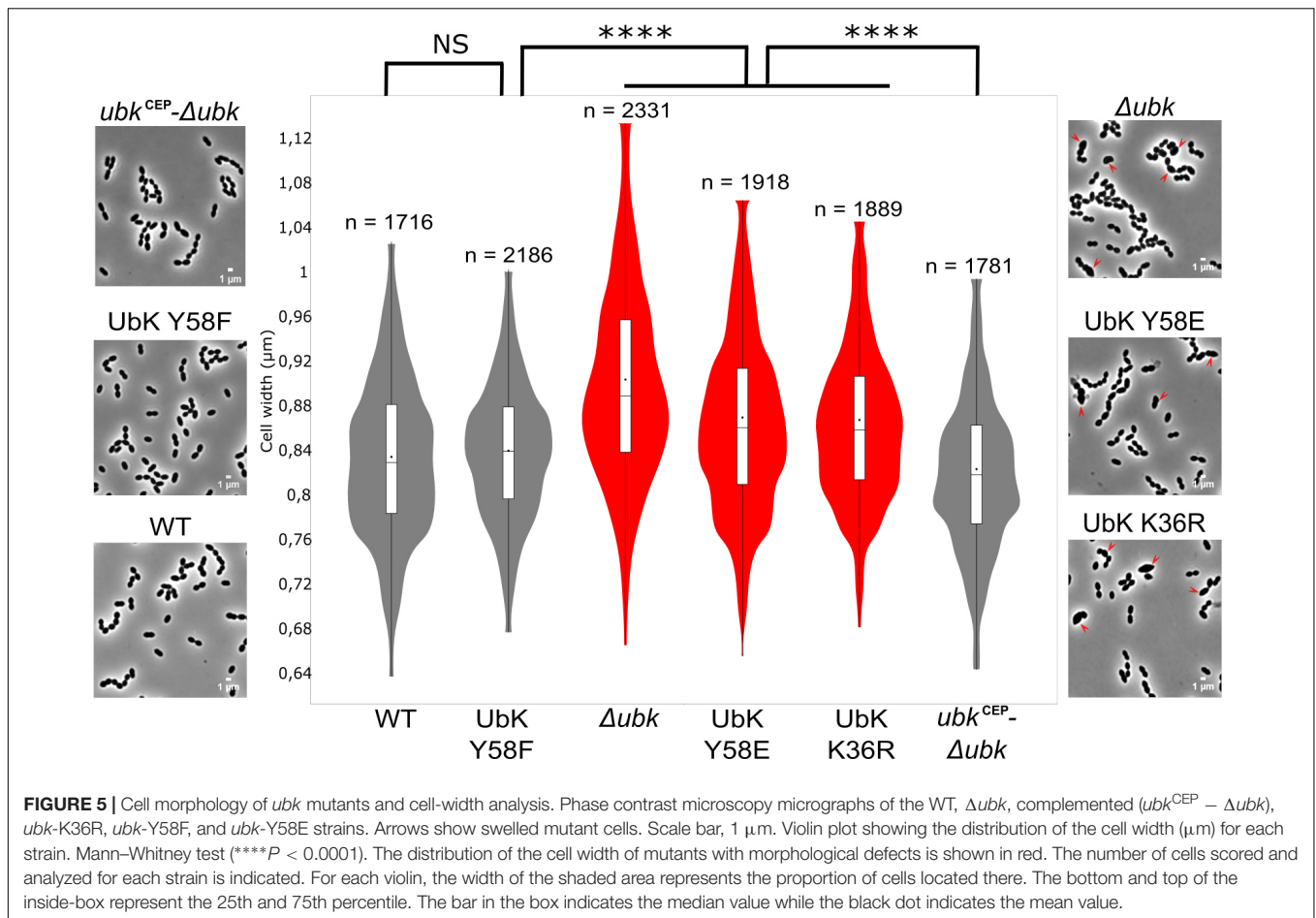
the UbK phosphorylation signal (**Supplementary Figure 5**). This reflected that non-radioactive ATP competes with the incorporation of radiolabeled [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-ATP. In light of the immunodetection of tyrosine autophosphorylation made with UbK purified directly from *E. coli* cells (**Figure 2**), it shows that purified UbK-6His contained a mix of phosphorylated and non-phosphorylated forms of UbK. ATP hydrolysis activity of UbK-6His reflects therefore the activity of both phosphorylated and dephosphorylated forms. The difference between ATP hydrolysis activities of UbK-Y58F-6His and UbK-Y58E-6His confirms that UbK dephosphorylation hampers its ability to hydrolyze ATP. Consistent with the growth defect observed for  $\Delta ubk$ , *ubk*-K36R and *ubk*-Y58E pneumococcal mutants compared to WT and *ubk*-Y58F (**Figure 3**), these findings show that ATP hydrolysis by UbK is modulated by its autophosphorylation and suggest that a balanced ratio between the phosphorylated form and the non-phosphorylated form is required for the pneumococcal growth.

### *ubk* Mutants With Growth Defects All Show an Abnormal Morphology

The growth defects of *ubk* mutants prompted us to analyze the morphology of cells by contrast phase microscopy. As shown in





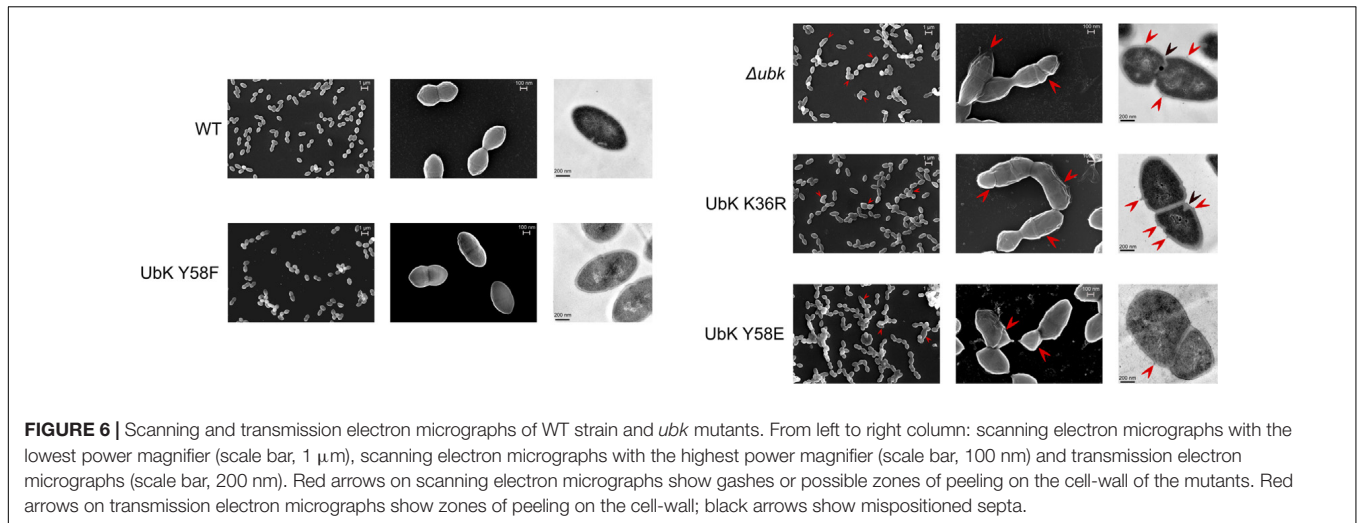


**Figure 5**, all mutants with growth defects ( $\Delta ubk$ , *ubk*-K36R and *ubk*-Y58E) showed a phenotype characterized by cells with an aberrant morphology. Indeed, cells appeared swelled and bigger. This visual impression was confirmed statistically by analyzing a large number of cells (**Figure 5**). More precisely, the analysis of cell size-parameters showed that these cells are wider than for the WT cells. Consistent with the normal growth measured for *ubk*-Y58F and *ubk* complemented ( $ubk^{CEP} - \Delta ubk$ ) cells, these cells did not display any defects and are similar to WT cells. This indicates that the slow and delayed growth of UbK mutants is likely due to a defect in cell morphogenesis and that UbK is required in this process.

The bacterial cell wall, whose main component is the peptidoglycan, is responsible of the bacterial cell shape (Typas et al., 2011). We therefore observed the cells by transmission and scanning electron microscopy to evaluate the presence of potential defects in the cell wall ultrastructure of *ubk* mutants. As shown in **Figure 6**, transmission electron microscopy (TEM) images showed that the integrity of the cellular envelope was compromised. Indeed, we detected small cell wall extrusion at the surface of cells, reminiscent of cell wall peeling, in  $\Delta ubk$ , *ubk*-K36R and *ubk*-Y58E mutants. In addition, these defects were associated with an abnormal positioning and/or orientation of the septum plane and shape (**Figure 6**). Such defects were not

observed in WT and *ubk*-Y58F cells. On the other hand, scanning electronic microscopy (SEM) further revealed the presence of gashes in the cell walls of  $\Delta ubk$ , *ubk*-K36R and *ubk*-Y58E mutants with cells even not properly covered by the cell wall envelop at the poles (**Figure 6**).

Considering the aberrant cell shape of  $\Delta ubk$ , *ubk*-K36R and *ubk*-Y58E mutants, we questioned the localization of UbK. We therefore analyzed the cellular localization of the diverse UbK mutant forms using fluorescence microscopy. For that, we generated strains expressing the different forms of GFP-UbK (mutated on the catalytic lysine and Y58) from the *ubk* chromosomal locus. Expression of the GFP-UbK fusions in *gfp-ubk*, *gfp-ubk* K36R, *gfp-ubk* Y58F and *gfp-ubk* Y58E strains was analyzed by Western blot using an anti-GFP antibody and showed that fusions are produced at comparable levels (**Supplementary Figure 6A**). In addition, these mutant strains grew and presented a similar morphology as their non-fused *gfp* counterparts (**Supplementary Figures 6B,C** and **Figure 3**). We observed that UbK localized in the cytoplasm and that phosphorylation or dephosphorylation of UbK had no impact on its localization (**Figure 7**). Indeed, GFP-UbK, GFP-UbK K36R, GFP-UbK Y58F and GFP-UbK Y58E all localize in the cytoplasm. Altogether, these observations indicate that the assembly of the cell wall is compromised in absence of active UbK suggesting



**FIGURE 6 |** Scanning and transmission electron micrographs of WT strain and *ubk* mutants. From left to right column: scanning electron micrographs with the lowest power magnifier (scale bar, 1  $\mu$ m), scanning electron micrographs with the highest power magnifier (scale bar, 100 nm) and transmission electron micrographs (scale bar, 200 nm). Red arrows on scanning electron micrographs show gashes or possible zones of peeling on the cell-wall of the mutants. Red arrows on transmission electron micrographs show zones of peeling on the cell-wall; black arrows show mispositioned septa.

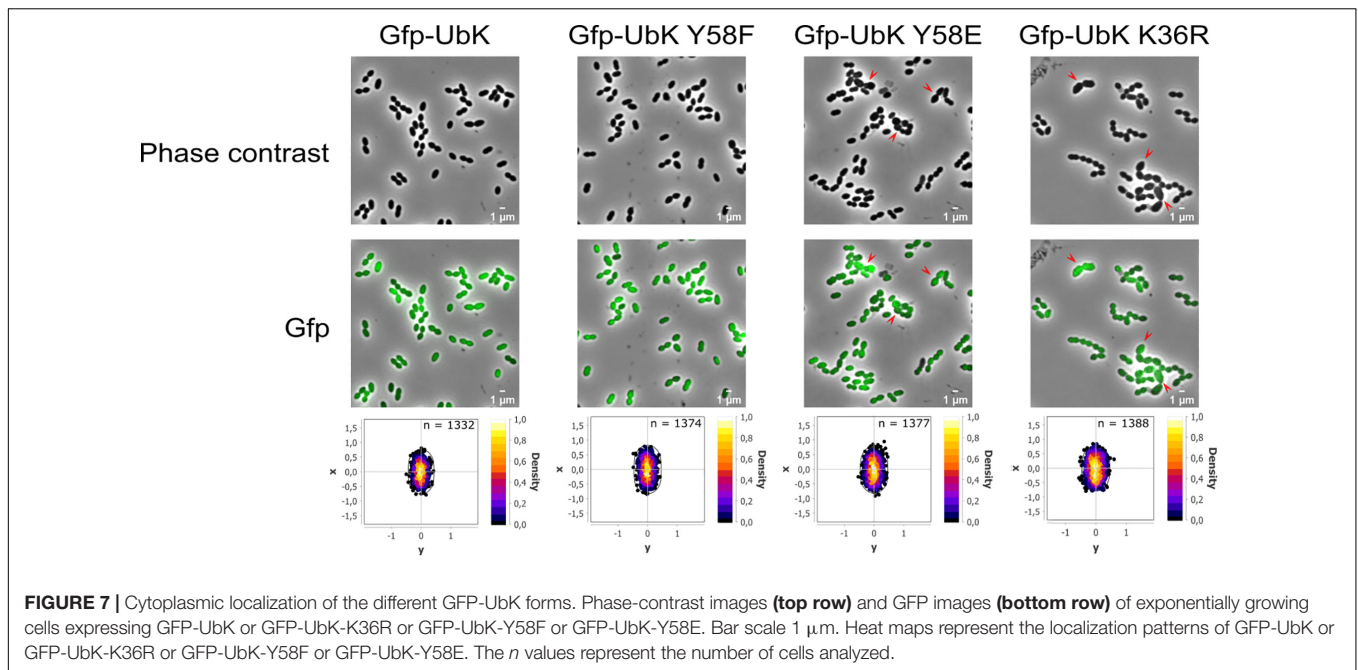
a role in cell morphogenesis that does not rely on particular localization of UbK.

## DISCUSSION

In this work, we have shown that UbK of *S. pneumoniae*, which belongs to a newly identified class of ubiquitous bacterial protein kinases (Nguyen et al., 2017), is crucial for the pneumococcal growth and its morphology. Opposing observations were previously reported concerning the essentiality of UbK (Freiberg et al., 2001; Kobayashi et al., 2003; Zalacain et al., 2003; Havarstein et al., 2006; Hunt et al., 2006; French et al., 2008; Karst et al., 2009; Molzen et al., 2011). We have now clarified the question for *S. pneumoniae* by showing that *ubk* deletion is actually co-selected with a single mutation (Figure 1) leading to the substitution of aspartic acid 151 for an alanine in the AsnS protein. The latter is described as a potential Asn-tRNA synthetase. AsnS enzymes are known to catalyze specific aminoacylation of tRNA<sub>Asn</sub> with asparagine (Asn-tRNA<sub>Asn</sub>) (Hausmann and Ibba, 2008). Another indirect route to Asn-tRNA<sub>Asn</sub> formation is often found in bacteria and involves the GatA/B/C subunit-proteins that transamidate Asp-tRNA<sub>Asn</sub> (Akochy et al., 2004; Mladenova et al., 2014). In the R6 *S. pneumoniae* strain, both the *gatA/B/C* and the *asnS* genes are found in the genome, suggesting that *asnS* could be dispensable in order to obtain Asn-tRNA<sub>Asn</sub>. Nevertheless, we confirmed the essentiality of *asnS* but not that of the aspartate 151 of AsnS that can be substituted for an alanine and be suppressive for the deletion of *ubk* (Figure 1). A direct relationship between the incorporation of Asn in proteins and the morphogenesis of *S. pneumoniae* has not been reported yet. Studying the potential connection between AsnS and UbK represents therefore a promising venue to better understand the physiology of the pneumococcus in the future. It is, however, tempting to make some assumptions. Indeed, the function of AsnS might be altered or enhanced when aspartate 151 is substituted for an alanine and sufficient to render UbK dispensable. Interestingly, substitution

of an aspartic acid for an alanine could mimic a phospho-ablative mutation. A recent comparative genomic study indicates that nature uses this trick by evolving serine, threonine, and tyrosine phosphorylation sites from Asp/Glu residues (Pearlman et al., 2011). An interesting speculation could be that AsnS activity could have been regulated by UbK and that this regulatory switch would have been lost in the course of evolution by the substitution of an Alanine for an Aspartic acid.

Despite *ubk* is largely but exclusively conserved in the bacterial kingdom, it is also intriguing that its genetic environment in *S. pneumoniae* is so different from that of *B. subtilis* and other bacteria like *E. coli* in which the genetic environment of *yjeE*, the *ubk* homolog, is still different (Mangat and Brown, 2008). This suggests that the cellular function of UbK could operate differently and even differ from one bacterium to another. In *S. pneumoniae*, *ubk* is described as the second gene of an operon of 4 genes, the first being *comM*. *comM* codes for a membrane immunity factor that protects competent cells against their own lytic enzymes (Havarstein et al., 2006). *ComM* was also shown to delay pneumococcal division during competence (Berger et al., 2017). The third *orf*, *spr1760*, codes for a protein of unknown function while the fourth codes for the essential LytR protein, a regulator of the LytR-Cps2A-Psr (LCP) protein family. LytR is proposed to belong to a type of enzymes required for the attachment of anionic cell wall polymers, like teichoic acids and capsular polysaccharides, to peptidoglycan (Kawai et al., 2011) and is also proposed to be involved in cell division and morphogenesis of the pneumococcus (Johnsborg and Havarstein, 2009). As described by Johnsborg and Havarstein (2009; Johnsborg and Havarstein, 2009), a  $\Delta$ *lytR* mutant was obtained with a low frequency close to that of the  $\Delta$ *ubk* mutant, confirming that *lytR* is also essential in absence of suppressive mutation(s). We constructed a  $\Delta$ *lytR* strain and observed that the deletion of *lytR* did not select the same suppressive mutation as that found with *ubk* deletion (i.e., in the *asnS* gene) (data not shown). Supported by the ectopic complementation of  $\Delta$ *ubk*, this substantiates distinct roles of UbK and LytR in morphogenesis and/or morphology.



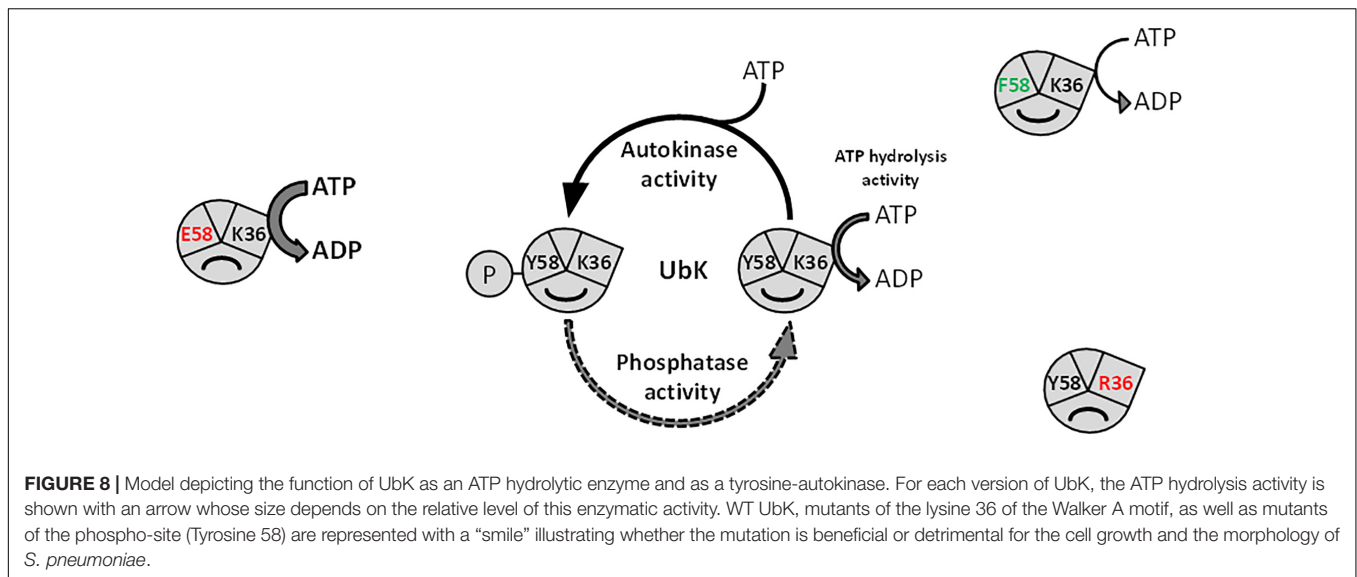
Based on the absence of *ubk* only in few *Mycoplasma* or *Ureaplasma*, that are devoid of cell-wall, and because the *ubk* homolog *yjeE* is potentially co-transcribed with an amidase gene in *H. influenzae*, it had been proposed that UbK would be implicated in the cell-wall assembly (Teplyakov et al., 2002). Nevertheless, if these arguments constitute clues, they are not direct proofs to assign a role to UbK in cell-wall homeostasis. Our findings that mutations or deletion of *ubk* affect the morphology of *S. pneumoniae* (Figures 5, 6) however support this claim and strongly suggest that UbK is required for the cell wall assembly in the pneumococcus.

An important feature is also that Y58 of UbK is not conserved in YdiB of *B. subtilis* (Nguyen et al., 2017). Indeed, the tyrosine 58 is replaced by a phenylalanine (F63). Considering that YdiB autophosphorylates mainly on Ser and Thr (Nguyen et al., 2017), and in view of all the observations discussed above, one can suggest that the mode of regulation of UbKs as well as their cellular functions have evolved independently to operate differently and to potentially serve distinct purposes. To strengthen this point of view, we tried to functionally complement the  $\Delta ubk$  pneumococcal mutant with the WT or F63Y alleles of the *ydiB* gene of *B. subtilis* but none of the two alleles allowed complementing the growth defects due to *ubk* deletion in *S. pneumoniae* (data not shown).

We have also shown that the ability of UbK to hydrolyze ATP prevails over its autophosphorylation since a phosphoablative mutant (*ubk*-Y58F) grows like a WT strain and does not display the morphological defects of the catalytic *ubk*-K36R mutant or the *ubk*-Y58E mutant. In addition, the K36R mutation is epistatic toward the Y58F or Y58E mutations since double mutants grow like the *ubk*-K36R mutant. This allows us to propose a model in which the level of initial phosphorylation enhances and determines the level of ATP hydrolysis activity and

subsequently the ability of the cells to grow properly. This model also implies that only a moderate range of ATP hydrolysis by UbK is required by the cell (Figure 8). In this model, one can speculate that a phosphatase, not yet identified, could consistently adjust the level of UbK phosphorylation and consequently the enhancement of UbK ATP hydrolysis. To date, the only well-known phosphatase of *S. pneumoniae* susceptible to play such a role is CpsB, the cognate phosphotyrosine-phosphatase of the BY-kinase CpsD (Standish et al., 2013). Nevertheless, as for protein-kinases, one cannot exclude that other types of atypical phosphatase idiosyncratic to bacteria may exist and that a specific phosphatase works together with UbK. Similarly, one cannot exclude the existence of potential phosphorylation substrate(s) of UbK that still remain unknown. However, we never obtained either *in vivo* evidence of UbK-mediated phosphorylation of an endogenous substrate (by probing whole cell lysates with anti-phosphotyrosine antibodies, Supplementary Figure 1B), nor *in vitro* UbK-mediated phosphorylation signals for proteins found to be phosphorylated on Tyr in the phosphoproteome (Sun et al., 2010) (data not shown). Altogether, these data suggest that UbK of *S. pneumoniae* could either act as a substrateless-kinase whose autophosphorylation level is crucial for the interaction with its partners and/or as a kinase phosphorylating with low efficiency some endogenous substrates. Whatever the case, UbK autophosphorylation and/or phosphorylation of its potential targets should be finely controlled for normal growth and morphogenesis of *S. pneumoniae*. Further phosphoproteomic studies are needed to gain a better understanding on the level of occupancy of the phosphosite of UbK and its potential substrates.

Until now, *S. pneumoniae* was thought to possess only one Y-kinase (CpsD) and one S/T-kinase (StkP). Our characterization of UbK supports the concept that bacteria could have evolved



other types of protein-kinases that will be first identifiable only biochemically. In the long term, it would therefore come as no surprise if all the phosphoproteins identified by high-throughput phosphoproteomic studies (84 in the phosphoproteome of *S. pneumoniae*, Sun et al., 2010) are phosphorylated by different types of protein-kinases, potentially forming a complex and interconnected regulatory network indispensable for the biology of the pneumococcal cell.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial Strains, Plasmids and Oligonucleotides

Strains and plasmids, and primers used in this study are listed in **Supplementary Material** as **Supplementary Tables 1, 2** respectively.

### Growth Conditions, Media and Bacterial Transformation

*Streptococcus pneumoniae* strains were cultivated at 37°C in Todd-Hewitt Yeast (THY) broth (Difco) or in C + Y medium (Martin et al., 1995). For growth curves, cells were previously grown in THY to an OD of 0.5 at 550 nm and aliquoted. From a frozen aliquot, cells were count and numbered by plating onto THY-agar plates. Cells were then diluted so that  $2.10^5$  to  $10^6$  bacteria/mL were inoculated in a fresh THY or C + Y liquid medium at 37°C. *S. pneumoniae* mutants were constructed by transformation of the WT strain or derivatives as previously described (Martin et al., 2000) using precompetent cells treated at 37°C during 30 min with the synthetic competence stimulating peptide 1 (CSP1) at the concentration of  $100 \text{ ng}/10^8$  cells to induce competence. Cells were then plated on THY-agar supplemented with 3% (vol/vol) defibrinated horse blood and incubated for 120 min at 37°C. Selection of transformants was then performed

by adding a THY-agar overlay containing the appropriate antibiotic (streptomycin  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , kanamycin  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , spectinomycin  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and further incubated for either 16 or 30 h at 37°C. The strains expressing an ectopic copy of *ubk*, *gfp-ubk*, *gfp-ubkK36R* or *gfp-ubkY58F* at the *amiF/treR* locus under the control of the maltose inducible promoter  $P_M$  (Guiral et al., 2006) were grown in THY or in C + Y medium containing either glucose or 1% maltose.

When transformation assays were conducted to compare the ability of different strains to transform different DNAs carrying *ubk* deletion, CSP was used to induce competence at a saturating concentration of  $100 \text{ ng}/10^8$  cells and a genomic control DNA (either DNA from the  $\Delta\text{phpP-stkP:spc-rpsL}$ , or the  $\Delta\text{spr1424:kan-rpsL}$  mutant) was used as a reference in order to standardize the transforming ability of the recipient strains.

The *E. coli* XL1-Blue strain was used as a host for cloning. *E. coli* BL21 (DE3) strain was used as a host for overexpression. Luria-Bertani (LB) broth and agar supplemented with appropriate antibiotic (tetracycline  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , ampicillin  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) were used for routine growth at 37°C. Strains used in this study are listed in **Supplementary Table 1**.

### Allelic Replacement Mutagenesis

To construct pneumococcus mutants (gene deletions, *gfp-ubk* fusions or site-directed mutagenesis), we used a two-step procedure based on a bicistronic *kan-rpsL* cassette called Janus (Sung et al., 2001) or a *spc-rpsL* cassette that we constructed on purpose called Janus2. The *spc-rpsL* Janus2 cassette was constructed by amplification of the *aad9* gene from the pR412 plasmid (a gift from J.P. Claverys' laboratory) and fused to the *rpsL* gene. A strain containing the *kan-rpsL* cassette in its genome was then transformed with the PCR fusion fragment that allowed the substitution of the *kan-rpsL* cassette with the *spc-rpsL* cassette. The *spc-rpsL* cassette was then PCR amplified from the genomic DNA of this strain with the same

primers as for the *kan-rpsL* cassette and used in the two-step Janus technique. Throughout this study, gene mutagenesis (*ubk* or *spr1397*) or fusions with *gfp* (*ubk*) were constructed at each native chromosomal locus. The mutated or fusion genes were thus expressed under the control of the native promoter and represented the only source of protein. Description of primers used for the construction of strains is provided in **Supplementary Table 2**. The full procedure is described in Fleurie et al. (2012). Briefly, the Janus or Janus2 cassette is used to replace the gene of interest. After transformation and selection, this confers resistance to kanamycin or spectinomycin and dominant streptomycin sensitivity (Kan<sup>R</sup>-Str<sup>S</sup> or Spc<sup>R</sup>-Str<sup>S</sup>) in an initial WT *rpsL1* genetic background. Then, a DNA fragment flanked on each end by sequences homologous to the upstream and downstream regions of the gene of interest is used to transform and substitute the Kan<sup>R</sup>-Str<sup>S</sup> or Spc<sup>R</sup>-Str<sup>S</sup> in the Kan<sup>R</sup> or Spc<sup>R</sup> strains. Integration of the fragment is selected in final non-polar markerless mutant strains by streptomycin resistance.

The gene encoding the monomeric GFP was from Martin et al. (2010). For allelic replacement of *spr1397*, which is an essential gene, by *spr1397* D121A, we used a one-step procedure without any selection and direct enzymatic digestion of a PCR fragment amplified from genomic DNA of each selected clone after transformation. Briefly, the introduction of the D121A mutation was concomitant with the introduction of an *AluI* restriction site in the recombinant PCR fragment covering upstream to downstream regions of *spr1397*. Characterization of the *AluI* restriction profile of the PCR fragments covering the *spr1397* region of transformants led to identify the *AluI* restriction site. The presence of the suppressive D121A mutation in these transformants was further confirmed by direct DNA sequencing of the *spr1397* locus.

## Complementation and/or Introduction of an Ectopic Copy of *ubk*

To obtain ectopic copies of *ubk*, *gfp-ubk*, *gfp-ubk* K36R or *gfp-ubk* Y58F at the *amiF/treR* locus under the control of the maltose inducible promoter P<sub>M</sub> (Guiral et al., 2006), we cloned an amplified copy of *ubk* in the pCEP plasmid that was transformed directly and integrated in the WT strain to generate the *ubk*<sup>+</sup>-*ubk*<sup>CEP</sup> strain (Guiral et al., 2006). We did the same with the *gfp* gene that was integrated into the WT reference strain to generate the *gfp*<sup>CEP</sup> strain. From these two strains PCR fusion fragments using primers designed to introduce single mutations were generated. These PCR fragments (*gfp-ubk*, *gfp-ubk*K36R or *gfp-ubk*Y58F) contained the upstream and downstream *amiF* and *kan-treR* regions of the site of integration of the CEP platform respectively. Transformation of the  $\Delta ubk$  mutant with these PCR fragments allowed obtaining the  $\Delta ubk$ -*gfp-ubk*<sup>CEP</sup>,  $\Delta ubk$ -*gfp-ubk*K36R<sup>CEP</sup> and  $\Delta ubk$ -*gfp-ubk*Y58F<sup>CEP</sup> strains from which the GFP-UbK fusion proteins were purified. When necessary, the absence of any rearranged copy of *ubk* in the genome of transformants was controlled by PCR with the 13/14 primer pair internal to *ubk* (**Supplementary Table 2**).

## Construction of Plasmids

DNA fragments coding for UbK were obtained by PCR using the chromosomal DNA of our reference WT strain as template. To introduce the different mutations corresponding to UbK K36R, UbK Y58F and UbK Y58E, we used each time a specific primer overlapping the mutated region. When introducing a single mutation, chimera DNA fragments using primers introducing the mutation were amplified. Then, these chimera DNA fragments were used as a primer for a second round of PCR to amplify the whole sequence. The fragments were then cloned between the *NdeI* and *PstI*, *BamHI* and *HindIII*, and *NdeI* and *BamHI* restriction sites of the pT7.7 (Cortay et al., 1994), pQE30 and pETphos plasmids respectively. The nucleotide sequences of all DNA fragments were sequenced to ensure error-free amplification. Plasmids and primers used in this study are listed in **Supplementary Tables 1, 2** respectively.

## Whole Genome Sequencing

For each bacterial strain (WT and two independent *ubk* mutants), extracted genomic DNA was sheared (1  $\mu$ g) following the manufacturer instructions using the S220 focused ultrasonicator (Covaris) to obtain a fragment distribution length from 100 bp to 1 kb, with an average peak around 400 bp. Each fragmented DNA material was then used to build a barcoded library using the Ion Xpress Plus gDNA (genomic DNA) Fragment Library Preparation kit (ThermoFisher) following the protocol of the kit. Libraries were then size-selected using the E-gel Electrophoresis system (Invitrogen) in order to select fragments from 350 to 450 bp in length. Libraries were qualified according to the concentration and distribution profile using the TapeStation 2200 (Agilent). Diluted libraries (26 pM) were mixed at an equimolar range and were amplified through emulsion PCR using the Ion PGM Template OT2 400 kit (ThermoFisher). Finally, the enriched libraries were loaded into a 316v2 chip and sequenced on the Ion PGM sequencer with the Ion PGM HiQ chemistry.

## Protein Purification

Recombinant plasmids overproducing the UbK, UbK-K36R, UbK-Y58F, and UbK-Y58E proteins were transformed into BL21 (DE3) *E. coli* strain. The transformants were grown at 37°C until the culture reached an OD<sub>600</sub> = 0.5. Expression was induced with IPTG to a final concentration of 0.5 mM and incubation was continued for 3 h. After 3 h culture at 37°C, cells were harvested and resuspended in buffer A (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5; NaCl 300 mM; DTT 1 mM; imidazole 10 mM; glycerol 10%) containing 10 mg.L<sup>-1</sup> of lysozyme and 6 mg.L<sup>-1</sup> of DNase I and RNase A, and sonicated. After centrifugation at 15000 g for 30 min, the supernatant was loaded onto a Ni-NTA agarose column (Qiagen) and extensively washed with buffer A supplemented with 30 mM imidazole. Samples were eluted with buffer A supplemented with 300 mM imidazole. The fractions corresponding to the pure protein were pooled and dialyzed against the following buffer: HEPES 50 mM, pH 7.5; NaCl 100 mM; DTT 1 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; glycerol 10%. The protein concentrations were determined using a Coomassie Assay Protein Dosage Reagent (Uptima) and aliquots were stored at -80°C.

## GFP-Trap Method

The  $\Delta ubk$  *gfp-ubk*<sup>CEP</sup>,  $\Delta ubk$  *gfp-ubk* Y58F<sup>CEP</sup>, and  $\Delta ubk$  *gfp-ubk* K36R<sup>CEP</sup> strains were grown at 37°C in THY medium until OD<sub>550</sub> = 0.5 in presence of 1% maltose. After centrifugation at 5000 g for 10 min at 4°C, cell pellets were resuspended in 0.1 M Tris-HCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M sucrose, 0.1% Triton X100. After 30 min at 30°C and centrifugation at 13000 g for 20 min at 4°C, cells were incubated in a hypotonic buffer (0.1 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X100) during 15 min at 25°C. The lysate was centrifuged at 5000 g for 5 min at 4°C and incubated for 2 h at 4°C with the GFP-trap slurry as recommended by the GFP-Trap<sup>®</sup> A Chromotek protocol. After a centrifugation at 2700 g for 2 min at 4°C, the pellet was washed in a 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA 0.1% Triton X100 buffer and eluted directly in 2X Laemmli loading buffer before loading onto a SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

## Preparation of *S. pneumoniae* Protein Lysates

Cultures of *S. pneumoniae* cells were grown at 37°C in THY medium until OD<sub>550</sub> = 0.3. After centrifugation at 5000 g for 10 min at 4°C, cell pellets were resuspended in 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA. Cells were disrupted by sonication. The protein concentration was determined by the Bradford method using the Pierce protein assay reagent.

## Immunoblot Analysis

*In vivo* UbK autophosphorylation of GFP-UbK trapped proteins of *S. pneumoniae* was immunodetected using a mouse anti-phosphotyrosine monoclonal antibody 4G10 (Sigma-Aldrich) at 1/2000. Detection of GFP fusions was performed using a rabbit anti-GFP polyclonal antibody (AMS Biotechnology) at 1/10000. An anti-mouse secondary polyclonal antibody horseradish peroxidase (HRP) conjugated (Biorad) was used at 1/5000 to reveal immunoblots. Detection of enolase was performed using a rabbit anti-enolase polyclonal antibody at 1/250000.

## Autophosphorylation Assays With Radiolabeled ATP

*In vitro* phosphorylation of 2 µg of UbK-6His, 6His-UbK or 6His-UbK K36R was carried out for 2–20 min at 37°C in the presence of 0 to 1 mM ATP with 125 µCi/ml [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP as previously described (Vincent et al., 1999). After electrophoresis, radioactive proteins were visualized by autoradiography.

## ATP Hydrolysis Activity

The enzymatic assay used to measure the ATP hydrolysis activity couples the regeneration of ATP from the ADP produced to the conversion of phosphoenolpyruvate (PEP) to pyruvate by pyruvate kinase (PK) and the conversion of pyruvate to lactate by lactate dehydrogenase (LDH) (Jault et al., 1991). One mole of ATP hydrolyzed is directly converted to one mole of NADH oxidized to NAD<sup>+</sup>, and the ATP hydrolysis activity is monitored by the disappearance of NADH, followed at 340 nm. Specific activities are calculated from the Beer-Lambert law using the molar extinction coefficient of NADH (6200 mol.L<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) and

expressed in nmol of ATP.mg<sup>-1</sup> of UbK.min<sup>-1</sup>. Mixtures were prepared as described by Karst et al. (2009).

## Nano LC-MS/MS Analysis of Purified UbK

Purified UbK was in-gel digested using trypsin as described in Borchert et al. (2010) and peptide mixture was desalted using C18 StageTips (Rappsilber et al., 2007). Analysis of peptides was done on a Proxeon Easy-LC system (Proxeon Biosystems) coupled to an LTQ-Orbitrap-Elite mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with a nano electrospray ion source (Proxeon Biosystems) as described previously (Conzelmann et al., 2013).

Mass spectra were analyzed using the software suite MaxQuant, version 1.3.0.5 (Cox and Mann, 2008). Extracted peak lists were submitted to database search using the Andromeda search engine (Cox et al., 2011) to query target-decoy (Elias and Gygi, 2010) databases consisting of 35,214 protein entries from *S. pneumoniae* serotype 2 strain D39/NCTC 7466, and 2,029 protein entries from *S. pneumoniae* strain ATCC BAA-255, both obtained from Uniprot and against the sequence of the His-tagged protein UbK and 248 commonly observed contaminants. Trypsin was defined as protease and two missed cleavage sites were allowed. Acetylation at the N-terminus, oxidation of methionine and phosphorylation on serine, threonine, and tyrosine were set as variable modifications. Carbamidomethylation of cysteine was set as fixed modification. Initial precursor mass tolerance was set to six parts per million (ppm) at the precursor ion level and 20 ppm at the fragment ion level. Spectra of modified peptides were manually validated.

## Microscopy Techniques

GFP fusion of wild-type UbK or mutants were visualized by fluorescence microscopy using *S. pneumoniae* cell culture at OD<sub>550 nm</sub> = 0.1. Slides were visualized with a Nikon TiE microscope fitted with an Orca-CMOS Flash4 V2 camera with a 100 × 1.45 objective. Images were collected using NIS-Elements (Nikon). Images were analyzed using the software ImageJ<sup>1</sup> and the plugin MicrobeJ (Ducret et al., 2016).

For TEM, *S. pneumoniae* cells were grown at 37°C to an OD of 0.1 in THY medium. Samples were then collected, centrifuged and fixed overnight with 5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.5) at 4°C. Postfixation with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer was carried out for 1 h at room temperature. These fixed cells were dehydrated using a graded series of ethanol and embedded in LR-white at 60°C for 48 h. Ultrathin sections (60 nm) were obtained using a Leica UC7 microtome and were counterstained with uranyl acetate and lead citrate (Reichert Ultrastainer, Leica, Germany). Samples were examined with a Philips CM120 transmission electron microscope equipped with a Gatan Orius SC200 CCD camera.

For SEM, cells were grown at 37°C to an OD of 0.1 in THY medium, spotted onto poly-lysine coverslips, washed with phosphate-buffered saline, and fixed in 0.18 M cacodylate buffer (pH 7.6) containing 2% glutaraldehyde. All samples were then

<sup>1</sup><http://rsb.info.nih.gov/ij/>

dehydrated with a graded series of ethanol, passage in HMDS (1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane) and finally air dried. The dried samples were covered with a 10 nm-thick gold/platinum layer (MED20, Baltec). Samples were then observed with a Quanta 250 FEG (FEI) scanning electron microscope.

## DATA AVAILABILITY

The genomic data generated can be found in the NCBI Sequence Read Archive (PRJNA562556).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AP, SG, CF, CGa, and JT conducted all the experiments of cell biology, genetics, purified proteins, and performed the ATP hydrolysis assays and western blot analysis. CC performed the transmission electron microscopy images. MF-W and BM performed the mass spectrometry experiments. AP, SG, CF, CGa, and CC designed and analyzed the data together with SG, J-MJ, and CGr. SG and CGr wrote the manuscript. All authors edited the manuscript.

## REFERENCES

- Akochy, P. M., Bernard, D., Roy, P. H., and Lapointe, J. (2004). Direct glutaminylation of tRNA biosynthesis and indirect asparaginyl-tRNA biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 186, 767–776. doi: 10.1128/jb.186.3.767-776.2004
- Beilharz, K., Novakova, 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. doi: 10.1073/pnas.1119172109
- Berge, M. J., Mercy, C., Mortier-Barriere, I., Vannieuwenhze, M. S., Brun, Y. V., Grangeasse, C., et al. (2017). A programmed cell division delay preserves genome integrity during natural genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Commun.* 8:1621. doi: 10.1038/s41467-017-01716-9
- Bidnenko, V., Shi, L., Kobir, A., Ventroux, M., Pigeonneau, N., Henry, C., et al. (2013). *Bacillus subtilis* serine/threonine protein kinase YabT is involved in spore development via phosphorylation of a bacterial recombinase. *Mol. Microbiol.* 88, 921–935. doi: 10.1111/mmi.12233
- Borchert, N., Dieterich, C., Krug, K., Schutz, W., Jung, S., Nordheim, A., et al. (2010). Proteogenomics of *Pristionchus pacificus* reveals distinct proteome structure of nematode models. *Genome Res.* 20, 837–846. doi: 10.1101/gr.103119.109
- Burnside, K., and Rajagopal, L. (2012). Regulation of prokaryotic gene expression by eukaryotic-like enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 125–131. doi: 10.1016/j.mib.2011.12.006
- Campbell, T. L., Ederer, C. S., Allali-Hassani, A., and Brown, E. D. (2007). Isolation of the *rstA* gene as a multicopy suppressor of YjeE, an essential ATPase of unknown function in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 189, 3318–3321. doi: 10.1128/jb.00131-06
- Canova, M. J., and Molle, V. (2014). Bacterial serine/threonine protein kinases in host-pathogen interactions. *J. Biol. Chem.* 289, 9473–9479. doi: 10.1074/jbc.R113.529917
- Conzelmann, M., Williams, E. A., Krug, K., Franz-Wachtel, M., Macek, B., and Jekely, G. (2013). The neuropeptide complement of the marine annelid *Platynereis dumerilii*. *BMC Genomics* 14:906. doi: 10.1186/1471-2164-14-906
- Cortay, J. C., Negre, D., Scarabel, M., Ramseier, T. M., Vartak, N. B., Reizer, J., et al. (1994). In vitro asymmetric binding of the pleiotropic regulatory protein, FruR, to the ace operator controlling glyoxylate shunt enzyme synthesis. *J. Biol. Chem.* 269, 14885–14891.

## FUNDING

This work was supported by grants from the CNRS, the University of Lyon, the Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-BLAN-0143 and ANR-12-BSV3-0008-01), and the Bettencourt Schueller Foundation.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the contribution of the Protein Science platform of SFR Biosciences Gerland-Lyon Sud (UMS3444/US8), B. Gillet and S. Hughes from the Sequencing platform of the Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon and the Centre Technologique des Microstructures de l'Université Lyon I.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01942/full#supplementary-material>

- Cox, J., and Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26, 1367–1372. doi: 10.1038/nbt.1511
- Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R. A., Olsen, J. V., and Mann, M. (2011). Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.* 10, 1794–1805. doi: 10.1021/pr101065j
- Ducret, A., Quardokus, E. M., and Brun, Y. V. (2016). MicrobeJ, a tool for high throughput bacterial cell detection and quantitative analysis. *Nat. Microbiol.* 1:16077. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.77
- Dworkin, J. (2015). Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 24, 47–52. doi: 10.1016/j.mib.2015.01.005
- Elias, J. E., and Gygi, S. P. (2010). Target-decoy search strategy for mass spectrometry-based proteomics. *Methods Mol. Biol.* 604, 55–71. doi: 10.1007/978-1-60761-444-9\_5
- 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. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07962.x
- Fleurie, A., Lesterlin, C., Manuse, S., Zhao, C., Cluzel, C., Lavergne, J. P., et al. (2014a). MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* 516, 259–262. doi: 10.1038/nature13966
- Fleurie, A., Manuse, S., Zhao, C., Campo, N., Cluzel, C., Lavergne, J. P., et al. (2014b). Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. *PLoS Genet.* 10:e1004275. doi: 10.1371/journal.pgen.1004275
- Freiberg, C., Wieland, B., Spaltmann, F., Ehlert, K., Brotz, H., and Labischinski, H. (2001). Identification of novel essential *Escherichia coli* genes conserved among pathogenic bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 483–489.
- French, C. T., Lao, P., Loraine, A. E., Matthews, B. T., Yu, H., and Dybvig, K. (2008). Large-scale transposon mutagenesis of *Mycoplasma pulmonis*. *Mol. Microbiol.* 69, 67–76. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06262.x
- Grangeasse, C. (2016). Rewiring the pneumococcal cell cycle with serine/threonine- and tyrosine-kinases. *Trends Microbiol.* 24, 713–724. doi: 10.1016/j.tim.2016.04.004
- Grangeasse, C., Cozzone, A. J., Deutscher, J., and Mijakovic, I. (2007). Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends Biochem. Sci.* 32, 86–94. doi: 10.1016/j.tibs.2006.12.004
- Guiral, S., Henard, V., Laaberki, M. H., Granadel, C., Prudhomme, M., Martin, B., et al. (2006). Construction and evaluation of a chromosomal expression

- platform (CEP) for ectopic, maltose-driven gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* 152, 343–349. doi: 10.1099/mic.0.28433-0
- Hausmann, C. D., and Ibba, M. (2008). Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 705–721. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00119.x
- Havarstein, 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.
- Henriques, M. X., Rodrigues, T., Carido, M., Ferreira, L., and Filipe, S. R. (2011). Synthesis of capsular polysaccharide at the division septum of *Streptococcus pneumoniae* is dependent on a bacterial tyrosine kinase. *Mol. Microbiol.* 82, 515–534. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07828.x
- Henriques-Normark, B., and Normark, S. (2010). Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. *Exp. Cell Res.* 316, 1408–1414. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.03.003
- Hunt, A., Rawlins, J. P., Thomaides, H. B., and Errington, J. (2006). Functional analysis of 11 putative essential genes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 152, 2895–2907. doi: 10.1099/mic.0.29152-0
- Jadeau, F., Bechet, E., Cozzzone, A. J., Deleage, G., Grangeasse, C., and Combet, C. (2008). Identification of the idiosyncratic bacterial protein-tyrosine kinase (BY-kinase) family signature. *Bioinformatics* 21, 2427–2430. doi: 10.1093/bioinformatics/btn462
- Jadeau, F., Grangeasse, C., Shi, L., Mijakovic, I., Deleage, G., and Combet, C. (2012). BYKdb: the bacterial protein tyrosine kinase database. *Nucleic Acids Res.* 40, D321–D324. doi: 10.1093/nar/gkr915
- Jault, J. M., Di Pietro, A., Falson, P., and Gautheron, D. C. (1991). Alteration of apparent negative cooperativity of ATPase activity by alpha-subunit glutamine 173 mutation in yeast mitochondrial F1. Correlation with impaired nucleotide interaction at a regulatory site. *J. Biol. Chem.* 266, 8073–8078.
- Johnsborg, O., and Havarstein, L. S. (2009). Pneumococcal LytR, a protein from the LytR-CpsA-Psr family, is essential for normal septum formation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 191, 5859–5864. doi: 10.1128/JB.00724-09
- Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C., and Andrew, P. W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 288–301. doi: 10.1038/nrmicro1871
- Karst, J. C., Foucher, A. E., Campbell, T. L., Di Guilmi, A. M., Stroebel, D., Mangat, C. S., et al. (2009). The ATPase activity of an 'essential' *Bacillus subtilis* enzyme, YdiB, is required for its cellular function and is modulated by oligomerization. *Microbiology* 155, 944–956. doi: 10.1099/mic.0.021543-0
- Kawai, Y., Marles-Wright, J., Cleverley, R. M., Emmins, R., Ishikawa, S., Kuwano, M., et al. (2011). A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins. *EMBO J.* 30, 4931–4941. doi: 10.1038/emboj.2011.358
- Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., et al. (2003). Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4678–4683.
- Lee, J. J., Kan, C. M., Lee, J. H., Park, K. S., Jeon, J. H., and Lee, S. H. (2014). Phosphorylation-dependent interaction between a serine/threonine kinase PknA and a putative cell division protein Wag31 in *Mycobacterium tuberculosis*. *New Microbiol.* 37, 525–533.
- Leipe, D. D., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., and Aravind, L. (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J. Mol. Biol.* 317, 41–72. doi: 10.1006/jmbi.2001.5378
- Mangat, C. S., and Brown, E. D. (2008). Known bioactive small molecules probe the function of a widely conserved but enigmatic bacterial ATPase, YjeE. *Chem. Biol.* 15, 1287–1295. doi: 10.1016/j.chembiol.2008.10.007
- Manuse, S., Fleurie, A., Zucchini, L., Lesterlin, L., and Grangeasse, C. (2016). Role of eukaryotic-like serine/threonine kinases in bacterial cell division and morphogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 41–56. doi: 10.1093/femsr/fuv041
- Martin, B., Garcia, P., Castanie, M. P., and Claverys, J. P. (1995). The recA gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction. *Mol. Microbiol.* 15, 367–379. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02250.x
- Martin, B., Granadel, C., Campo, N., Henard, V., Prudhomme, M., and Claverys, J. P. (2010). Expression and maintenance of ComD-ComE, the two-component signal-transduction system that controls competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 75, 1513–1528. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07071.x
- Martin, B., Prudhomme, M., Alloing, G., Granadel, C., and Claverys, J. P. (2000). Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 38, 867–878. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02187.x
- Mercy, C., Ducret, A., Slager, J., Lavergne, J.-P., Freton, C., Nagarajan, S. N., et al. (2019). RocS drives chromosome segregation and nucleoid protection in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Microbiol.* doi: 10.1038/s41564-019-0472-z [Epub ahead of print].
- Mijakovic, I., Grangeasse, C., and Turgay, K. (2016). Exploring the diversity of protein modifications: special bacterial phosphorylation systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 398–417. doi: 10.1093/femsr/fuw003
- Mijakovic, I., and Macek, B. (2012). Impact of phosphoproteomics on studies of bacterial physiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 877–892. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00314.x
- Mladenova, S. R., Stein, K. R., Bartlett, L., and Sheppard, K. (2014). Relaxed tRNA specificity of the *Staphylococcus aureus* aspartyl-tRNA synthetase enables RNA-dependent asparagine biosynthesis. *FEBS Lett.* 588, 1808–1812. doi: 10.1016/j.febslet.2014.03.042
- Molzen, T. E., Burghout, P., Bootsma, H. J., Brandt, C. T., Van Der Gaast-De Jongh, C. E., Eleveld, M. J., et al. (2011). Genome-wide identification of *Streptococcus pneumoniae* genes essential for bacterial replication during experimental meningitis. *Infect. Immun.* 79, 288–297. doi: 10.1128/IAI.00631-10
- Nguyen, H. A., El Khoury, T., Guiral, S., Laaberki, M. H., Candusso, M. P., Galisson, F., et al. (2017). Expanding the kinome world: a new protein kinase family widely conserved in bacteria. *J. Mol. Biol.* 429, 3056–3074. doi: 10.1016/j.jmb.2017.08.016
- Nourikyan, J., Kjos, M., Mercy, C., Cluzel, C., Morlot, C., Noiro-Gros, M. F., et al. (2015). Autophosphorylation of the bacterial tyrosine-kinase CpsD connects capsule synthesis with the cell cycle in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Genet.* 11:e1005518. doi: 10.1371/journal.pgen.1005518
- Pearlman, S. M., Serber, Z., and Ferrell, J. E. Jr. (2011). A mechanism for the evolution of phosphorylation sites. *Cell* 147, 934–946. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.052
- Rappsilber, J., Mann, M., and Ishihama, Y. (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* 2, 1896–1906. doi: 10.1038/nprot.2007.261
- Reinstein, J., Schlichting, I., and Wittinghofer, A. (1990). Structurally and catalytically important residues in the phosphate binding loop of adenylate kinase of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 29, 7451–7459. doi: 10.1021/bi00484a014
- Soulat, D., Jault, J.-M., Geourjon, C., Gouet, P., Cozzzone, A. J., Grangeasse, C. (2007). Tyrosine-kinase Wzc from *Escherichia coli* possesses an ATPase activity regulated by autophosphorylation. *FEMS Microbiol. Lett.* 274, 252–259. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00841.x
- Standish, A. J., Salim, A. A., Capon, R. J., and Morona, R. (2013). Dual inhibition of DNA polymerase PolC and protein tyrosine phosphatase CpsB uncovers a novel antibiotic target. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 167–172. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.049
- Standish, A. J., Whittall, J. J., and Morona, R. (2014). Tyrosine phosphorylation enhances activity of pneumococcal autolysin LytA. *Microbiology* 160, 2745–2754. doi: 10.1099/mic.0.080747-0
- Sun, X., Ge, F., Xiao, C. L., Yin, X. F., Ge, R., Zhang, L. H., et al. (2010). Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *J. Proteome Res.* 9, 275–282. doi: 10.1021/pr900612v
- 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. doi: 10.1128/aem.67.11.5190-5196.2001
- Tacconelli, E. (2017). *Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery and Development of New Antibiotics*. WHO Report, 1–7. Geneva: WHO.
- Tepljakov, A., Obmolova, G., Tordova, M., Thanki, N., Bonander, N., Eisenstein, E., et al. (2002). Crystal structure of the YjeE protein from *Haemophilus*



- influenzae*: a putative Atpase involved in cell wall synthesis. *Proteins* 48, 220–226. doi: 10.1002/prot.10114
- Thanassi, J. A., Hartman-Neumann, S. L., Dougherty, T. J., Dougherty, B. A., and Pucci, M. J. (2002). Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 30, 3152–3162. doi: 10.1093/nar/gkf418
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C. A., and Vollmer, W. (2011). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 123–136. doi: 10.1038/nrmicro2677
- Vilcheze, C., Molle, V., Carrere-Kremer, S., Leiba, J., Mourey, L., Shenai, S., et al. (2014). Phosphorylation of KasB regulates virulence and acid-fastness in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 10:e1004115. doi: 10.1371/journal.ppat.1004115
- Vincent, C., Doublet, P., Grangeasse, C., Vaganay, E., Cozzone, A. J., and Duclos, B. (1999). Cells of *Escherichia coli* contain a protein-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. *J. Bacteriol.* 181, 3472–3477.
- Wright, D. P., and Ulijasz, A. T. (2014). Regulation of transcription by eukaryotic-like serine-threonine kinases and phosphatases in Gram-positive bacterial pathogens. *Virulence* 5, 863–885. doi: 10.4161/21505594.2014.983404
- Yoon, H. S., Lee, M. H., Xiong, J., and Golden, J. W. (2003). Anabaena sp. strain PCC 7120 hetY gene influences heterocyst development. *J. Bacteriol.* 185, 6995–7000. doi: 10.1128/jb.185.23.6995-7000.2003
- Zalacain, M., Biswas, S., Ingraham, K. A., Ambrad, J., Bryant, A., Chalker, A. F., et al. (2003). A global approach to identify novel broad-spectrum antibacterial targets among proteins of unknown function. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 6, 109–126. doi: 10.1159/000076741
- Zucchini, L., Mercy, C., Garcia, P. S., Cluzel, C., Gueguen-Chaignon, V., Galisson, F., et al. (2018). PASTA repeats of the protein kinase StkP interconnect cell constriction and separation of *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Microbiol.* 3, 197–209. doi: 10.1038/s41564-017-0069-3

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Pelletier, Freton, Gally, Trouve, Cluzel, Franz-Wachtel, Macek, Jault, Grangeasse and Guiral. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Supplementary material

### Supplementary tables

**Supplementary table 1. Strains and plasmids used in this study**

Strains	Genotype and description	References
<i>S. pneumoniae</i> strains		
R800	<i>S. pneumoniae</i> R6 derivative strain	Gift from J.-P. Claverys, Toulouse, France
WT	R800 <i>rpsL1</i> ; Str <sup>R</sup>	(Fleurie et al., 2012)
$\Delta ubk::kan-rpsL$	$\Delta ubk::kan-rpsL$ , <i>spr1397D151A</i> ; Kan <sup>R</sup> ; original <i>ubk</i> mutant with <i>ubk</i> suppressive mutation	This study
$\Delta ubk::spc-rpsL$	$\Delta ubk::spc-rpsL$ , <i>spr1397D151A</i> ; Spc <sup>R</sup> ; original <i>ubk</i> mutant with <i>ubk</i> suppressive mutation	This study
$\Delta ubk$	$\Delta ubk$ , <i>spr1397D151A</i> ; Str <sup>R</sup>	This study
<i>ubk</i> <sup>+</sup> - <i>ubk</i> <sup>CEP</sup>	CEP[P <sub>m</sub> <i>ubk</i> ] ; Kan <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup>	This study
$\Delta ubk::spc-rpsL -ubk$ <sup>CEP</sup>	$\Delta ubk::spc-rpsL$ , CEP[P <sub>m</sub> <i>ubk</i> ] ; Kan <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	This study
$\Delta ubk-ubk$ <sup>CEP</sup>	$\Delta ubk$ , CEP[P <sub>m</sub> <i>ubk</i> ] ; Kan <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup>	This study
<i>suppressor</i> -WT	<i>spr1397D151A</i> ; Str <sup>R</sup>	This study
<i>gfp</i> <sup>CEP</sup>	CEP[P <sub>m</sub> <i>gfp</i> ] ; Kan <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup>	This study
$\Delta ubk$ <i>gfp-ubk</i> <sup>CEP</sup>	$\Delta ubk$ , CEP[P <sub>m</sub> <i>gfp-ubk</i> ] , <i>spr1397D151A</i> ; Kan <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup>	This study
$\Delta ubk$ <i>gfp-ubkK36R</i> <sup>CEP</sup>	$\Delta ubk$ , CEP[P <sub>m</sub> <i>gfp-ubkK36R</i> ] , <i>spr1397D151A</i> ; Kan <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup>	This study
$\Delta ubk$ <i>gfp-ubkY58F</i> <sup>CEP</sup>	$\Delta ubk$ , CEP[P <sub>m</sub> <i>gfp-ubkY58F</i> ] , <i>spr1397D151A</i> ; Kan <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup>	This study
<i>ubkK36R</i>	<i>ubkK36R</i> , <i>spr1397D151A</i> ; Str <sup>R</sup>	This study
<i>ubkY58F</i>	<i>ubkY58F</i> , <i>spr1397D151A</i> ; Str <sup>R</sup>	This study
<i>ubkY58E</i>	<i>ubkY58E</i> , <i>spr1397D151A</i> ; Str <sup>R</sup>	This study
<i>gfp-ubk</i>	<i>gfp-ubk</i> , <i>spr1397D151A</i> ; Str <sup>R</sup>	This study
<i>gfp-ubkK36R</i>	<i>gfp-ubkK36R</i> , <i>spr1397D151A</i> ; Str <sup>R</sup>	This study
<i>gfp-ubkY58F</i>	<i>gfp-ubkY58F</i> , <i>spr1397D151A</i> ; Str <sup>R</sup>	This study
<i>gfp-ubkY58E</i>	<i>gfp-ubkY58E</i> , <i>spr1397D151A</i> ; Str <sup>R</sup>	This study
<i>ubkK36R</i> - <i>Y58F</i>	<i>ubkK36R</i> - <i>Y58F</i> , <i>spr1397D151A</i> ; Str <sup>R</sup>	This study
<i>ubkK36R</i> - <i>Y58E</i>	<i>ubkK36R</i> - <i>Y58E</i> , <i>spr1397D151A</i> ; Str <sup>R</sup>	This study
$\Delta phpP-stkP::spc-rpsL$	$\Delta phpP-stkP::spc-rpsL$ ; Spc <sup>R</sup>	This study
$\Delta spr1424::kan-rpsL$	$\Delta spr1424::kan-rpsL$ ; kan <sup>R</sup>	This study
<i>E. coli</i> strains		
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac- F'</i> [ <i>proAB+ lacIq lacZΔM15 Tn10</i> (Tc <sup>R</sup> )] ; Tet <sup>R</sup>	(Bullock et al., 1987)

BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) λ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ])	(Studier and Moffatt, 1986)
Plasmids		
pUC57- <i>gfp</i>	pUC57 derivative, encoding the <i>gfp</i> gene, from Met1 to Lys239, Amp <sup>R</sup>	(Martin et al., 2010)
pT7.7	pT7.7 derivative, encoding a His-tag for C-terminal fusions; Amp <sup>R</sup>	(Cortay et al., 1994)
pT7.7 <i>ubk</i>	pT7.7 derivative, encoding <i>ubk</i> ; Amp <sup>R</sup>	This study
pT7.7 <i>ubkY58F</i>	pT7.7 derivative, encoding <i>ubkY58F</i> ; Amp <sup>R</sup>	This study
pT7.7 <i>ubkY58E</i>	pT7.7 derivative, encoding <i>ubkY58E</i> ; Amp <sup>R</sup>	This study
pT7.7 <i>ubkK36R</i>	pT7.7 derivative, encoding <i>ubkK36R</i> ; Amp <sup>R</sup>	This study
pQE30 <i>ubk</i>	pQE30 derivative, encoding <i>ubk</i> ; Amp <sup>R</sup>	This study
pETphos <i>ubkK36R</i>	pETphos derivative, encoding <i>ubkK36R</i> ; Amp <sup>R</sup>	This study
pR412	Donor for Spc <sup>R</sup> cassette, Amp <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Gift from J.-P. Claverys and M. Prudhomme, Toulouse, France

**Supplementary table 2. List of primers**

Purpose	Gene or plasmid	N <sup>o</sup> a and name	Sequence 5'-3' <sup>b</sup> , gene, position <sup>c</sup>
Construction of <i>S. pneumoniae</i> strains	Janus cassettes	1 Janus (+)	<u>CCGTTTGATTTTAAATGGATAATG</u> , upstream of <i>kan</i> or <i>aad9</i> in Janus or Janus2 cassettes, -70 or -144 respectively
		2 Janus (-)	<u>AGAGACCTGGGCCCTTCC</u> , downstream of <i>kan</i> or <i>aad9</i> in Janus or Janus2 cassettes, +1341 or +1301 respectively
	<i>ubk</i> or <i>ubk-gfp</i> at <i>ubk</i> genuine locus or on CEP platform	3 up <i>ubk</i> (+)	<u>TATGGATCCAAATCAATGAGAATCTTATT TTTGTTAGC</u> , upstream of <i>ubk</i> , -703
		4 <i>ubk</i> (-)	<u>CATTATCCATTAAAAATCAAACGGACTCT TATTATACCAAAAACCTTTTCTTTTGTG</u> , <i>ubk</i> , 0
		5 <i>ubk</i> (+)	<u>GGAAAGGGGCCAGGTCTCTATGGAGTA TGAATTGCTCATTAGGG</u> , <i>ubk</i> , +433
		6 down <i>ubk</i> (-)	<u>ATACCTCCTACTGCATCCAC</u> , downstream of <i>ubk</i> , +1444

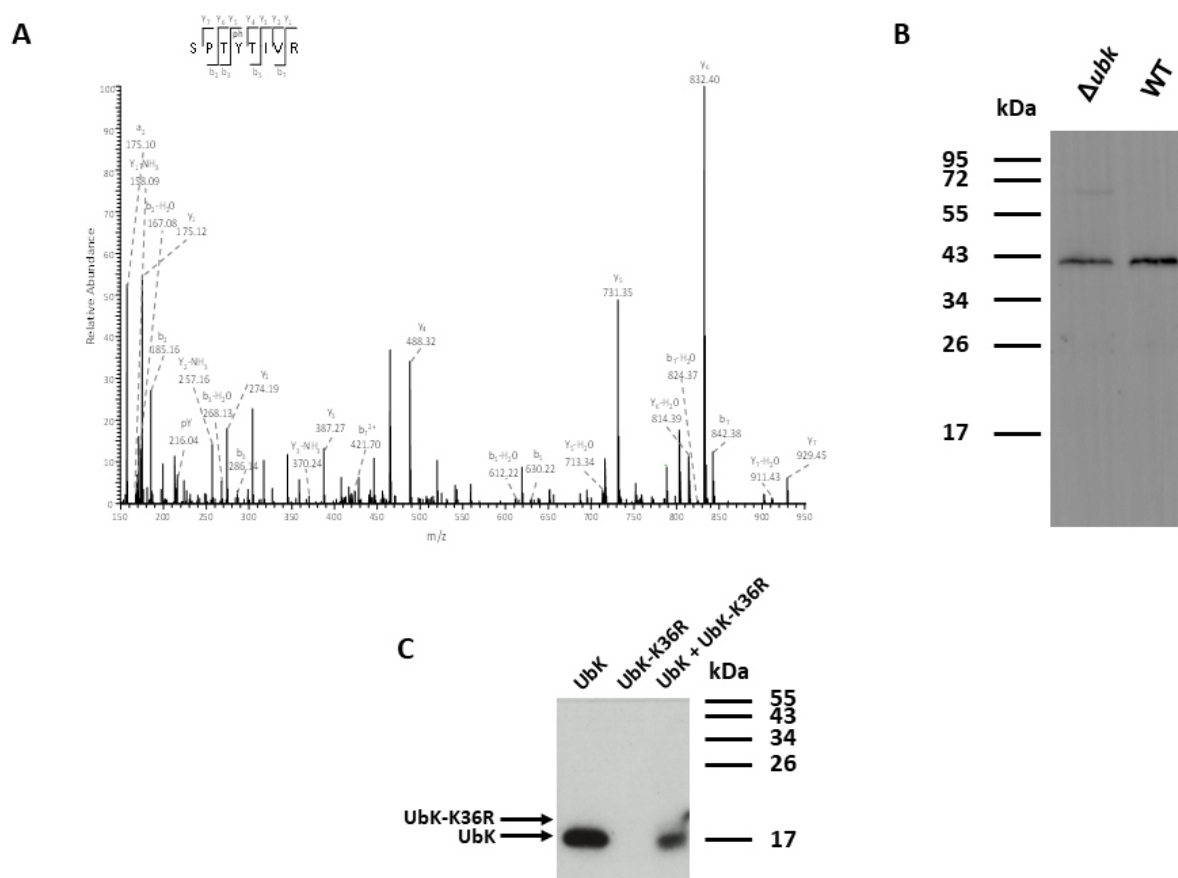
Construction of plasmids for protein expression in <i>E. coli</i>		7 <i>ubk</i> (-)	<u>CCCTAATGAGCAATTCATACTCCATACTC</u> <u>TTATTATACCAAAAACCTTTTCTTTTGTG</u> , <i>ubk</i> , 0
		8 <i>ubk</i> (+)	<u>ATGGAGTATGAATTGCTCATTAGGG</u> , <i>ubk</i> , +433
		9 <i>gfp-ubk</i> (-)	<u>CAATTCTTCACCTTTAGAAACCATACTCT</u> <u>TATTATACCAAAAACCTTTTCTTTTGTG</u> , <i>gfp</i> , 0
		10 <i>gfp-ubk</i> (+)	<u>GTATAAACTCGAGGGATCCGGAATGTA</u> <u>CACAAAAAATGAAGAAGAGTTGC</u> , <i>ubk</i> , 0
		11 <i>gfp</i> (+)	<u>ATGGTTTCTAAAGGTGAAGAATTG</u> , <i>gfp</i> , 0
		12 <i>gfp</i> (-)	<u>TCCGGATCCCTCGAGTTTATACAATTCA</u> <u>TCCATACCATG</u> , <i>gfp</i> , +717
		13 <i>ubk</i> (+)	TAATAAGACCATGGACACAAAAAATGAA GAAGAGTTGC, <i>ubk</i> , 0 (NcoI)
		14 <i>ubk</i> (-)	TATGGATCCTCATACTCCATATTGAAGCT CC, <i>ubk</i> , +444 (BamHI)
	<i>gfp</i> on CEP platform	15 <i>gfp</i> (-)	ATGAATCCCATGGTTTCTAAAGGTG, <i>gfp</i> , 0 (NcoI)
		16 <i>gfp</i> (+)	TATGGATCCTTATTTATACAATTCATCCAT ACCATGTG, <i>gfp</i> , +720 (BamHI)
	<i>spr1397</i>	17 up <i>spr1397</i> (+)	GCAGCAGTTGAGGCTCTATCAGG, upstream of <i>spr1397</i> , -733
		18 <i>spr1397</i> (-)	<u>CATTATCCATTA AAAATCAAACGGTATTT</u> <u>TTCCTTTTCTTTTTTATTCTTTATGGC</u> , <i>spr1397</i> , 0
		19 <i>spr1397</i> (+)	<u>GGAAAGGGGCCAGGTCTCTGAACAGGA</u> <u>AAACGCCCATGTGG</u> , <i>spr1397</i> , +1341
		20 down <i>spr1397</i> (-)	GCCTGTTGGCGCCACATAACG, downstream of <i>spr1397</i> , +1971
		21 up <i>spr1397</i> (+)	GTGAGAATGATTGATCATTTTGAGATTAA G, upstream of <i>spr1397</i> , -391
		22 <i>spr1397</i> (-)	TATCCATCAAAAA <u>AGCT</u> GTTCCGTGTTC, <i>spr1397</i> , +376 (AluI)
		23 down <i>spr1397</i> (-)	GGTAAGTGAGGTTTCGCTCAC, downstream of <i>spr1397</i> , +1449
	pT7.7- <i>ubk</i>	24 <i>ubk</i> (+)	GGGAATCCATATGTACACAAAAAATGAA GAAGAGTTG, <i>ubk</i> , 0 (NdeI)
		25 <i>ubk</i> (-)	TATCTGCAGTACTCCATATTGAAGCTCCT CTAAC, <i>ubk</i> , +441 (PstI)
		26 <i>ubk</i> (+)	TATGGATCCTACACAAAAAATGAAGAAG AGTTG, <i>ubk</i> , 0 (BamHI)
		27 <i>ubk</i> (-)	TATAAGCTTTCATACTCCATATTGAAGCTC , <i>ubk</i> , +441 (HindIII)
		28 <i>ubk</i> (-)	TATGGATCCTCATACTCCATATTGAAGCT CCTC, <i>ubk</i> , +441 (BamHI)
		29 <i>ubk</i> K36R (-)	AAGGTCGTTTCGACCTGCACC, <i>ubk</i> , +117
		30 <i>ubk</i> Y58F (+)	GTCCACCTTTACTATCGTG, <i>ubk</i> , +164
		31 <i>ubk</i> Y58E (+)	GTCCACCGAAACTATCGTG, <i>ubk</i> , +164

<sup>a</sup> Forward and reverse primers are represented by plus (+) or minus (-), respectively.

<sup>b</sup> For primer pairs 1/4, 2/5, 7/8, 9/11, 10/12, 1/18 and 2/19, sequences underlined are complementary to each other. The sequences in bold in primers 10 and 12, inserted between the *gfp* and *ubk* genes, code for a linker between GFP and UbK. For primers 13 to 16, 22, 24 to 28 restriction sites are italicized and the corresponding restriction enzymes are indicated into brackets. For primers 22 and 29 to 31, mutated bases are in bold.

<sup>c</sup> - and + indicate respectively upstream and downstream positions relative to the ATG codon of the corresponding gene.

## Supplementary figures

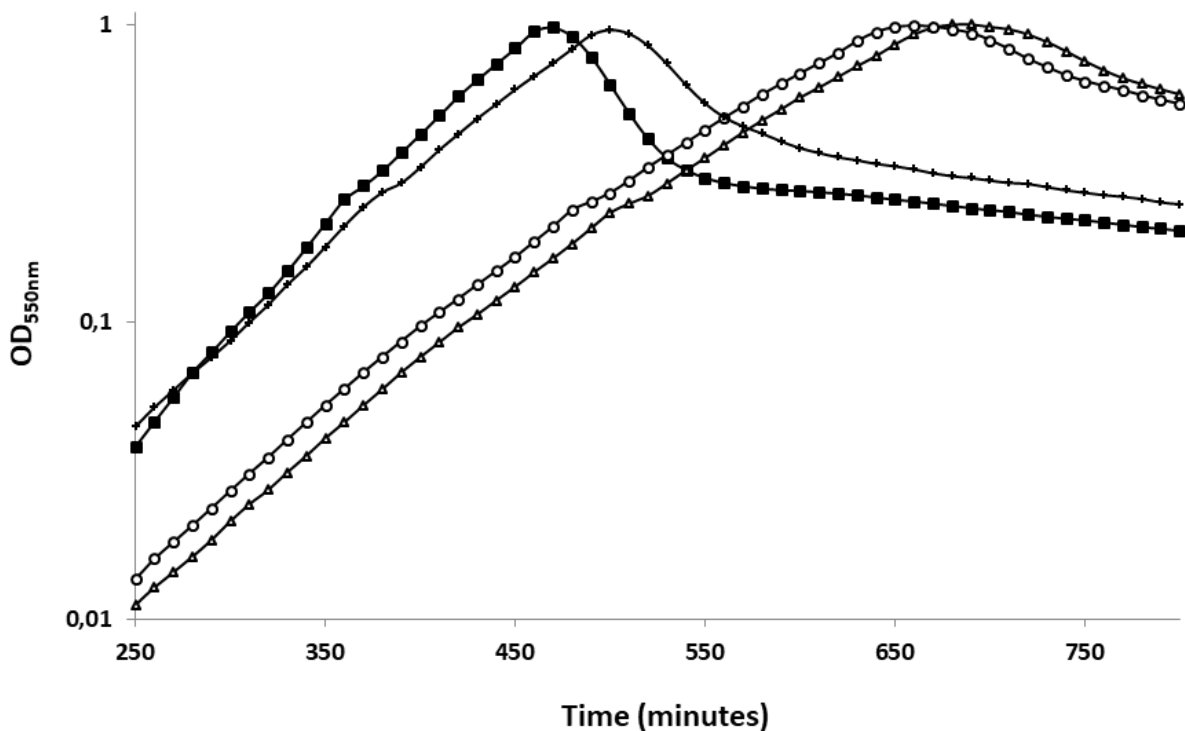


### Supplementary figure 1.

#### LC-MS/MS phosphorylation analysis of GFP-UbK purified from *S. pneumoniae*, immunodetection of potential substrates of UbK and autoradiography of cis-autophosphorylation of UbK

A. Purified GFP-tagged UbK was digested in gel with trypsin, and peptide mixture was analysed by LC-MS/MS. UbK is phosphorylated on tyrosine 58. The spectrum shows the fragmentation pattern of the phosphopeptide SPTY(ph)TIVR corresponding to amino acids 55-62.

- B. Western immunoblot of whole cell lysates from strains  $\Delta ubk$  and WT probed with an anti-phosphotyrosine antibody.
- C. UbK purified from *E. coli* with a 1.3 kDa 6His tag was incubated at 37° C during 20 min with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP and UbK-K36R purified from *E. coli* with a 2.7 kDa 6His tag. Mixtures were then analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. Arrows show the location of the UbK and UbK-K36R bands revealed with Coomassie blue staining.

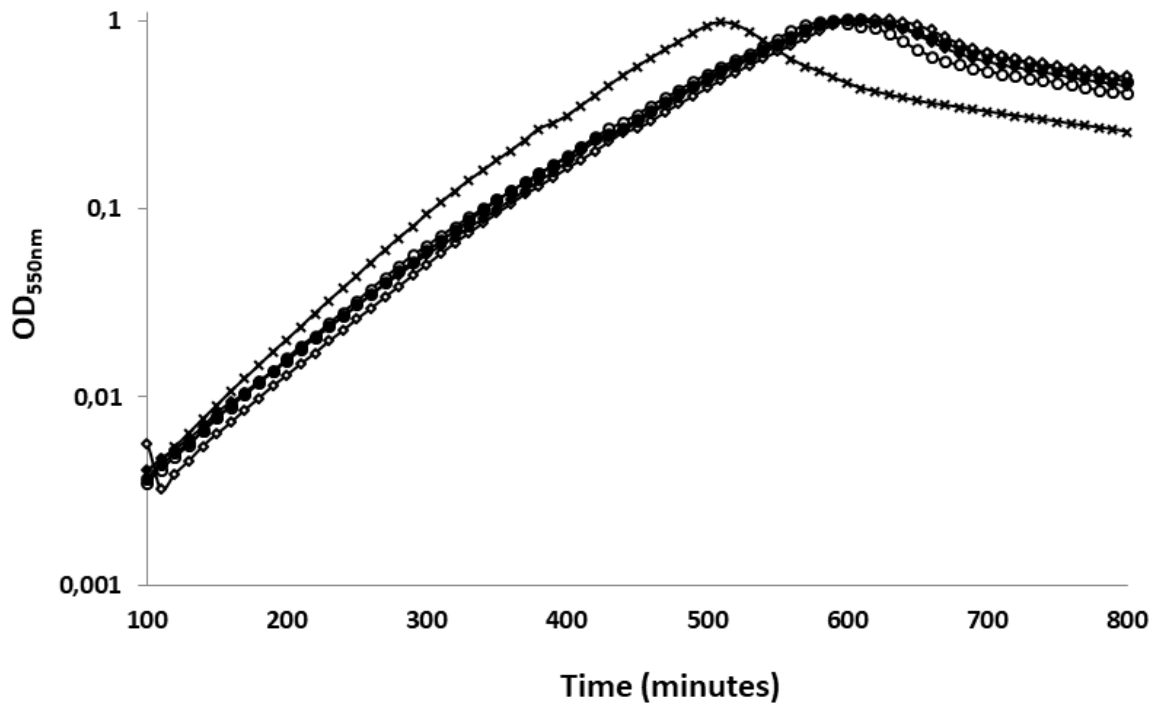


**Supplementary figure 2.**

**Representative growth curve of the *suppressor*-WT strain**

Comparative growth curves at 37°C of the WT (black squares),  $\Delta ubk$  (white triangles), *ubk*-K36R (white circles), *suppressor*-WT (black crosses) strains. Bacteria were diluted so that  $2 \cdot 10^5$  cells were inoculated at t=0 min.

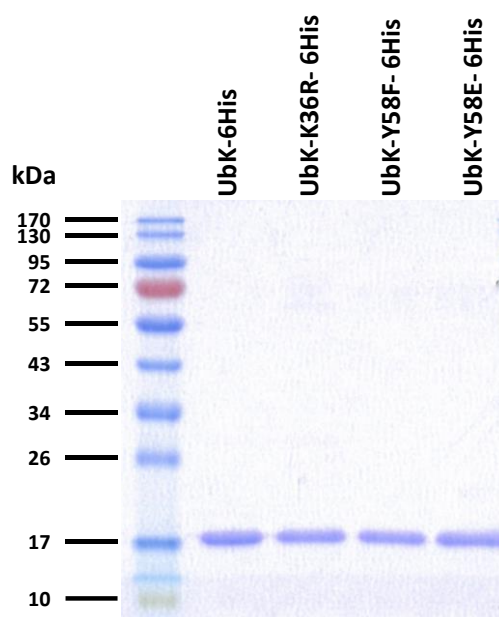
Growths were led in triplicate.



**Supplementary figure 3.**

**Representative growth curves of catalytic / phosphomimetic or –ablative *ubk* mutants**

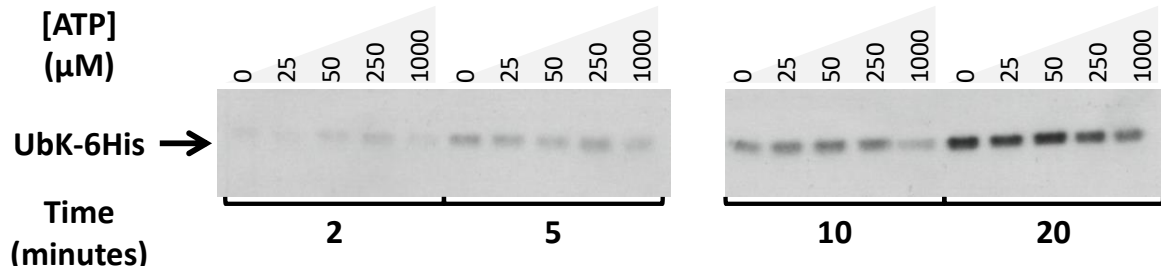
Comparative growth curves at 37°C of the *ubk*-K36R (white circles), *ubk*-Y58E (black circles), *ubk*-Y58F (black crosses), *ubk*-K36R-Y58F (white diamonds) and *ubk*-K36R-Y58E (black diamonds) strains. Bacteria were diluted so that  $2.10^5$  cells were inoculated at t=0 min. Growths were led in triplicate.



**Supplementary figure 4.**

**SDS-PAGE analysis of purified UbK-6His mutants.**

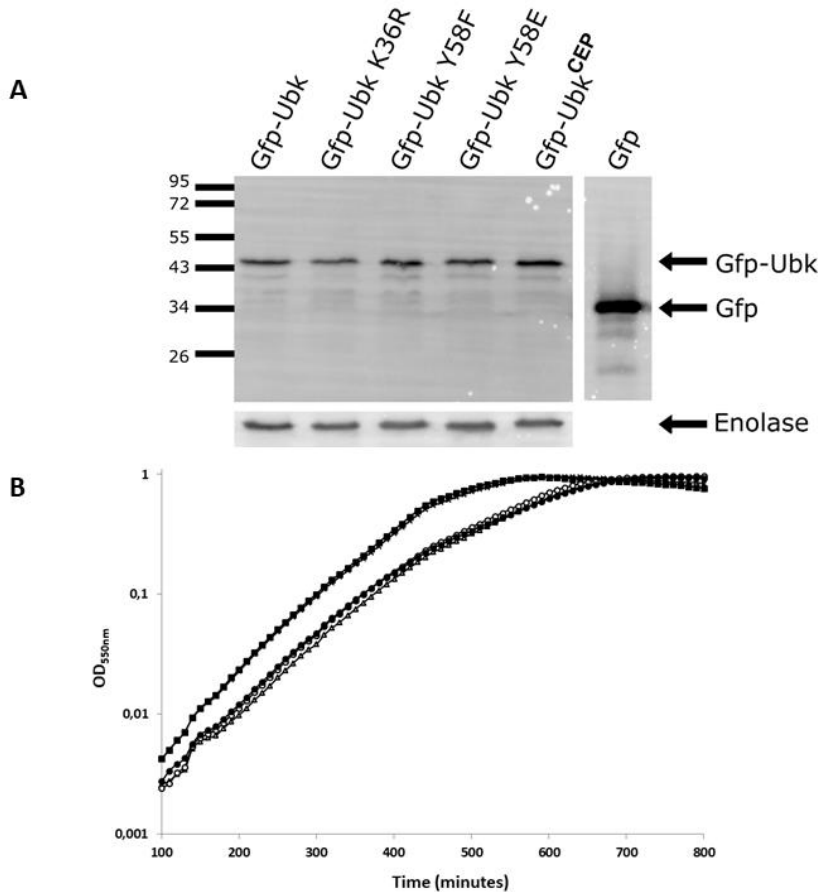
The pneumococcal UbK-6His, UbK-K36R-6His, UbK-Y58F-6His and UbK-Y58E-6His purified from *E. coli* were submitted to gel electrophoresis and stained with Coomassie Blue. 2  $\mu$ g of each protein were loaded on the gel.



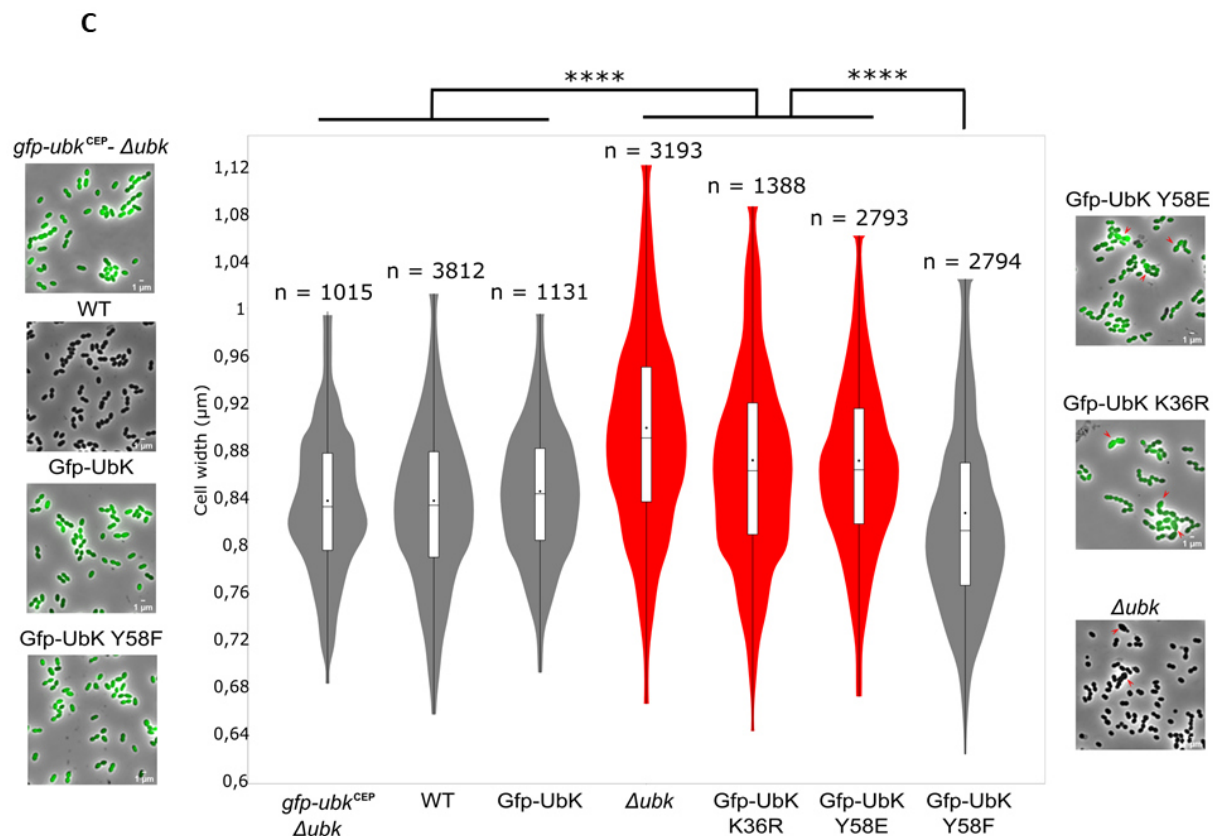
**Supplementary figure 5.**

**Autoradiography of UbK autophosphorylation after different times of incubation and varying concentrations of non-radioactive ATP**

UbK-6His purified from *E. coli* was incubated at 37° C during 2 to 20 min with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP and varying concentrations of non-radioactive ATP. Mixtures were then analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.







### Supplementary figure 6.

#### Growth curves of the *gfp-ubk* mutants, immunodetection of the GFP-UbK fusion proteins and morphology analysis of *gfp-ubk* mutants

A. Western immunoblot of whole cell lysates from strains *gfp-ubk*, *gfp-ubk*-K36R, *gfp-ubk*-Y58F, *gfp-ubk*-Y58E and *gfp-ubk*<sup>CEP</sup> and of purified GFP probed with an anti-GFP polyclonal antibody. To estimate the relative quantity of proteins and to compare the different lanes, we used the enolase as an internal standard and detected it with specific antibodies as presented in the lower part of the figure.

B. Representative growth curves at 37°C of the different *gfp-ubk* mutants. Bacteria were diluted so that  $2.10^5$  cells were inoculated at  $t=0$  min.

*Δubk* (white triangles), *gfp-ubk* (black squares), *gfp-ubk*-K36R (white circles), *gfp-ubk*-Y58F (black crosses), *gfp-ubk*-Y58E (black circles).

C. Cell width analysis of *gfp-ubk* mutants. Violin plot showing the distribution of the cell width (µm) measured for each strain. Mann-Whitney test (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ). The distribution of the cell width of mutants with morphological defects is shown in red.

The number of cells scored and analyzed is indicated. For each violin, the width of the shaded area represents the proportion of cells located there. The bottom and top of the inside-box represent the 25th and 75th percentile. The bar in the box indicates the median value while the black dot indicates the mean value.

On phase contrast microscopy images, arrows show swelled mutant cells. Scale bar, 1 µm.

## References

- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., and Short, J.M. (1987). a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376.
- Cortay, J.C., Negre, D., Scarabel, M., Ramseier, T.M., Vartak, N.B., Reizer, J., Saier, M.H., Jr., and Cozzone, A.J. (1994). In vitro asymmetric binding of the pleiotropic regulatory protein, FruR, to the ace operator controlling glyoxylate shunt enzyme synthesis. *The Journal of biological chemistry* 269, 14885-14891.
- 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*. *Molecular microbiology* 83, 746-758.
- Martin, B., Granadel, C., Campo, N., Henard, V., Prudhomme, M., and Claverys, J.P. (2010). Expression and maintenance of ComD-ComE, the two-component signal-transduction system that controls competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology* 75, 1513-1528.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* 189, 113-130.

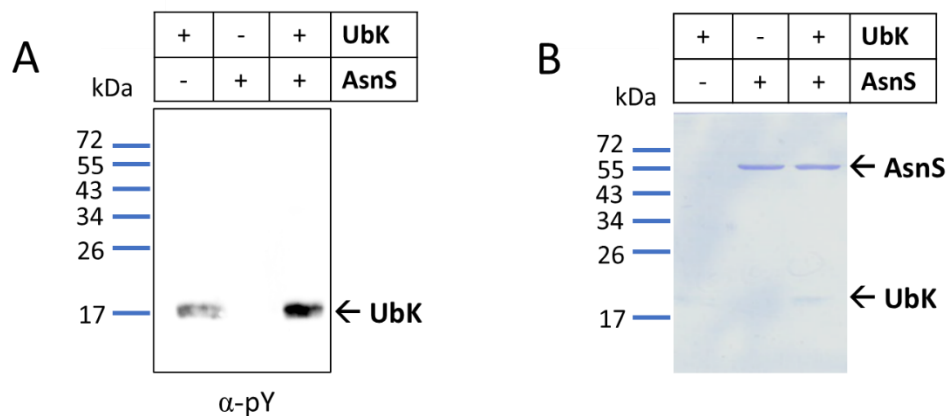


## II. Caractérisation du lien fonctionnel entre AsnS et UbK

La délétion d'*ubk* conduit à la co-occurrence d'une mutation suppressive dans le gène *asnS*. En effet, nous avons séquencé le génome complet de deux clones indépendants et observé la présence d'une mutation unique au niveau de l'Aspartate 121, qui est remplacé par une Alanine. La fonction d'AsnS chez le pneumocoque n'a pas été étudiée. Cependant, le gène *asnS* de *S. pneumoniae* présente une homologie avec des gènes bactériens codant des Asparaginyl-ARNt synthétases. Ces enzymes sont capables de charger l'Asparagine sur son ARN de transfert ARNt pour assurer l'incorporation de cet acide-aminé dans les protéines en cours de synthèse lors de la traduction. Il est à noter que l'existence d'une voie indirecte aboutissant à la formation d'un ARNt chargé d'une Asparagine a été également décrite chez le pneumocoque. En effet, un Aspartate peut être chargé sur l'ARNt de l'Asparagine, et ensuite être converti en Asparagine par les enzymes GatCAB (Hausmann & Ibba, 2008). Ces voies sont généralement exclusives l'une de l'autre, mais le pneumocoque possède des gènes correspondant aux deux voies. Nos tentatives de délétion du gène *asnS* ont échouées, suggérant ainsi que le gène *asnS* est essentiel. La mutation suppressive de l'Aspartate en Alanine en position 121 pourrait donc plutôt induire une modulation de l'activité de AsnS. De plus, nous avons émis l'hypothèse que cette mutation pourrait refléter un lien fonctionnel entre UbK et AsnS, au sein d'une relation de type protéine-kinase/protéine-substrat.

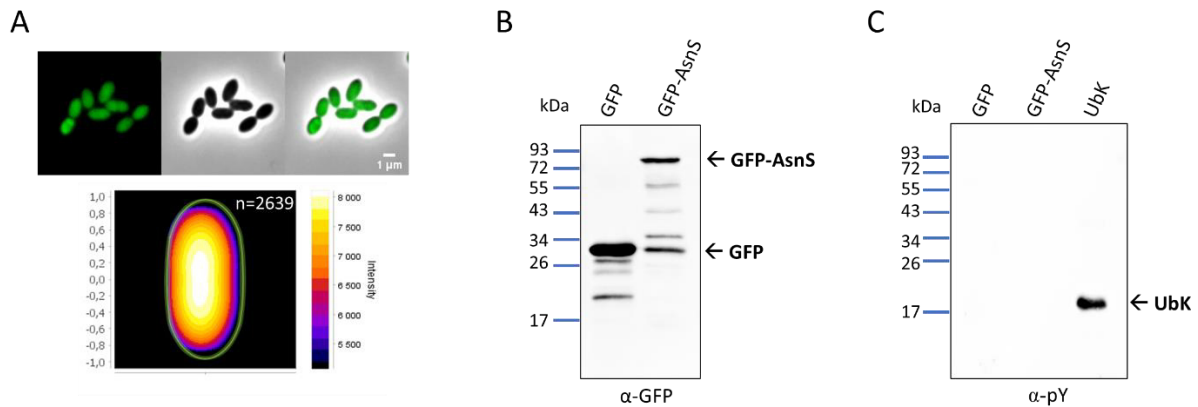
### 1. AsnS, une protéine-substrat ou partenaire d'UbK ?

Afin de mettre en évidence une phosphorylation éventuelle d'AsnS par UbK, nous avons purifié les protéines chez *E. coli*, et réalisé un test de phosphorylation *in vitro* en les incubant ensemble à 37°C. Ensuite, nous avons utilisé un anticorps anti-phosphotyrosine pour révéler les Tyrosines phosphorylées de ces deux protéines. Comme il l'a été montré dans l'article présenté précédemment, UbK est capable de s'autophosphoryler sur une Tyrosine *in vitro* (Figure 49A). Aucun signal de phosphorylation n'est détecté pour AsnS, en absence comme en présence d'UbK (Figure 46A et B). AsnS n'est donc pas phosphorylée par UbK sur une Tyrosine *in vitro*.



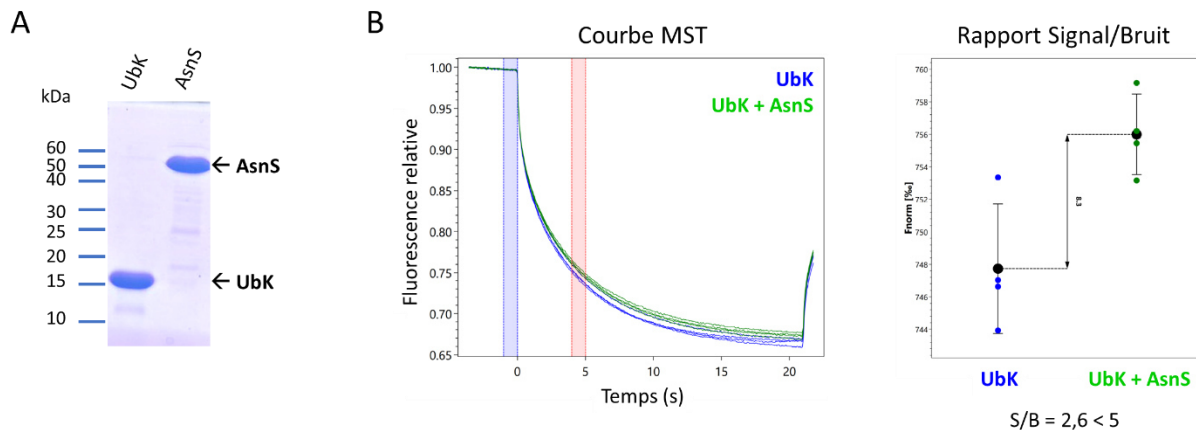
**Figure 46 : Test de phosphorylation d'AsnS par UbK *in vitro*.** Les protéines ont été mises en contact dans un rapport molaire 1:1 et incubées 30 min à 37°C en présence d'ATP 1 mM et de Mg<sup>2+</sup>. A. Immunodétection avec un anticorps anti-phosphotyrosine ( $\alpha$ -pY). B. Coloration de la membrane utilisée pour l'immunodétection au bleu de Coomassie.

Cependant, il n'est pas exclu que la phosphorylation d'AsnS requière des conditions nécessitant l'intervention d'un partenaire tiers. Nous avons donc évalué la phosphorylation d'AsnS *in vivo*. Pour cela, nous avons construit une souche produisant une version d'AsnS couplée à la GFP depuis le chromosome bactérien et avons réalisé une immunoprécipitation. Nous avons préalablement vérifié que la présence de la protéine de fusion GFP-AsnS n'impactait pas la morphologie du pneumocoque, suggérant que notre construction est fonctionnelle (Figure 47A). En accord avec ceci, l'essentialité d'AsnS nous assure que la construction est tolérée par la bactérie. En effet, une activité altérée d'AsnS ne serait pas viable pour les cellules. Nous avons ensuite visualisé la fluorescence de GFP-AsnS par microscopie à contraste de phase et à fluorescence. La protéine GFP-AsnS est localisée uniformément dans le cytoplasme (Figure 47A). L'immunodétection de GFP-AsnS par un anticorps anti-GFP montre néanmoins que la fusion est partiellement dégradée, ce qui nous empêche de valider avec certitude la localisation uniforme de la fusion GFP-AsnS dans le cytoplasme (Figure 47B). Aucun signal associé à AsnS n'est détecté par un anticorps anti-phosphotyrosine (Figure 47C), traduisant qu'AsnS n'est pas phosphorylée par UbK sur une Tyrosine *in vivo* dans ces conditions.



**Figure 47 : Immunoprécipitation de GFP-AsnS.** A. Fonctionnalité et localisation de GFP-AsnS. La fluorescence de GFP-AsnS a été visualisée par microscopie à contraste de phase et à fluorescence. La localisation cytoplasmique est représentée par une carte de chaleur après analyse à l'aide de l'outil MicrobeJ. B. Immunodétection de l'immunoprécipitation de GFP-AsnS avec un anticorps anti-GFP ( $\alpha$ -GFP). C. Immunodétection de l'immunoprécipitation de GFP-AsnS avec un anticorps anti-phosphotyrosine ( $\alpha$ -pY).

Nous avons donc voulu tester si le lien génétique entre Ubk et AsnS pourrait être expliqué par l'interaction entre UbK et AsnS. Nous avons donc réalisé des expériences de thermophorèse à micro-échelle MST après purification des protéines chez *E. coli*, validation de leur intégrité par DLS et marquage d'UbK avec une molécule fluorescente (Figure 48A).

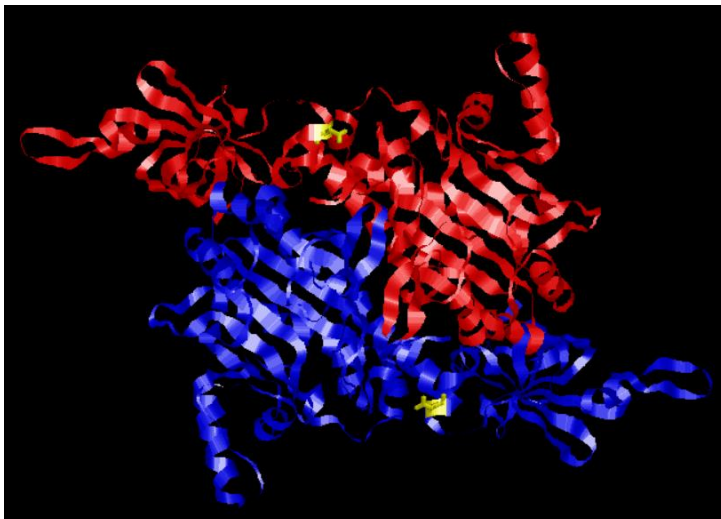


**Figure 48 : Thermophorèse d'UbK et AsnS.** A. Protéines UbK et AsnS purifiées sur gel SDS-PAGE. B. Expérience de MST réalisée entre NHS-red-UbK et AsnS. Courbe MST correspondant à l'intensité de fluorescence d'une condition en fonction du temps en secondes (s). L'expérience est répétée en triplicat pour chaque condition. Les courbes bleues et vertes correspondent aux l'intensité de fluorescence d'UbK seule et d'UbK en présence d'AsnS respectivement. Le rapport signal/bruit correspond à la différence entre l'intensité de fluorescence du complexe et celle de la cible seule et doit dépasser 5 pour être significatif.

La courbe MST ne montre pas de différence significative entre UbK seul et UbK éventuellement complexé à AsnS, avec un rapport signal/bruit insuffisant pour conclure à une interaction (Figure 48B). Ceci nous indique donc que le comportement d'UbK soumis à un gradient de température n'est pas modifié en présence d'AsnS, et que les deux protéines n'interagissent pas dans ces conditions.

## 2. AsnS, un substrat ancestral d'UbK ?

La structure d'homologues d'AsnS de *S. pneumoniae* est disponible dans la PDB (*Protein Data Bank*). Nous avons réalisé un modèle de la structure d'AsnS du pneumocoque avec le serveur de modélisation swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/>) en utilisant la structure d'AsnS de l'Archée *Pyrococcus horikoshii* (Code PDB : 1X54), qui présente 44% d'identité avec son homologue du pneumocoque. Ce modèle couvre 96% de la séquence d'AsnS du pneumocoque. AsnS se présente sous forme d'un homodimère, comme la plupart de ses homologues (Figure 49). De manière intéressante, l'Aspartate 121, muté en Alanine dans le mutant de délétion d'*ubk*, est exposé en surface de la protéine (Figure 49).

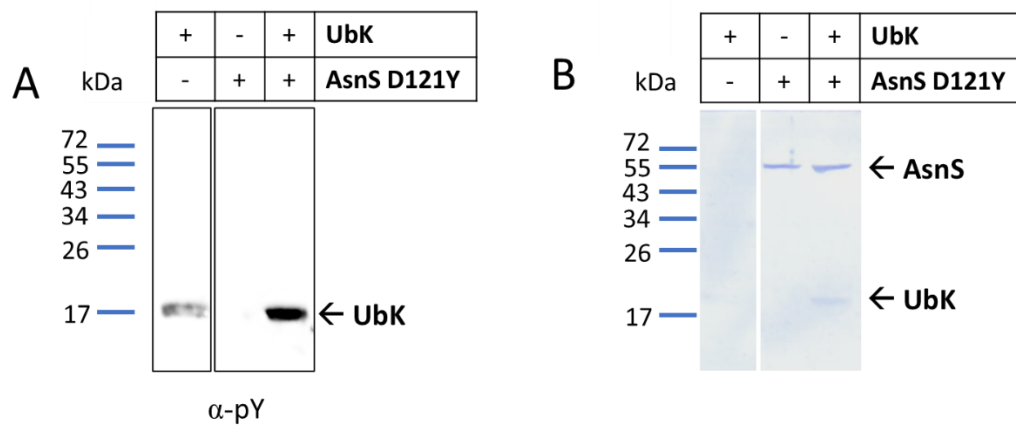


**Figure 49 : Modélisation de la structure d'AsnS de *S. pneumoniae* à partir de celle de *P. horikoshii*.** AsnS s'organise en dimère dont chaque monomère est représenté en rouge et en bleu. L'Aspartate 121 est représenté en jaune.

Une étude de Pearlman et ses collaborateurs suggère par des analyses bio-informatiques que les sites de phosphorylation Sérine/Thréonine/Tyrosine peuvent évoluer pour devenir des résidus acides Aspartate/Glutamate, qui miment une phosphorylation permanente, ou inversement en fonction des protéines (Pearlman et al., 2011). L'exposition

en surface de l'Aspartate dans le modèle présenté, nous a conduit à nous demander si AsnS n'a pas été un substrat « ancestral » d'UbK qui aurait évolué afin de s'affranchir de la nécessité d'un contrôle par phosphorylation.

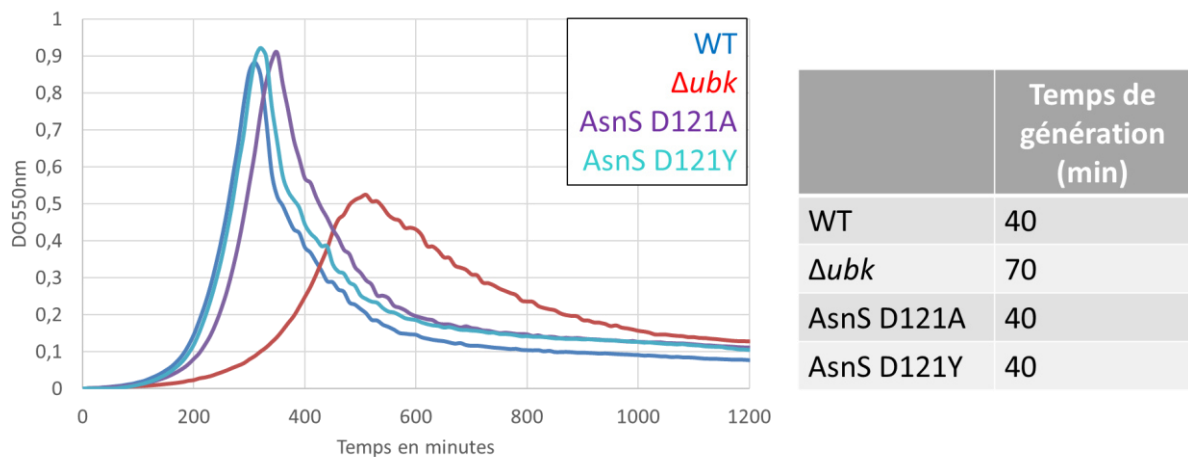
UbK étant une Tyrosine-kinase, nous avons généré une version d'AsnS dans lequel l'Aspartate 121 est muté en Tyrosine, et produit cette protéine mutante chez *E. coli*. Nous avons alors réalisé des tests de phosphorylation *in vitro* avec la protéine purifiée en présence d'UbK (Figure 50). La révélation avec un anticorps anti-phosphotyrosine ne révèle pas de signal de phosphorylation d'AsnS, montrant que la Tyrosine en position 121 n'est pas phosphorylée par UbK *in vitro* dans ces conditions.



**Figure 50 : Test de phosphorylation d'AsnS D121Y par UbK *in vitro* dans un rapport molaire 1:1.** Les protéines ont été mises en contact dans un rapport molaire 1:1 et incubées 30 min à 37°C en présence d'ATP 1 mM et de Mg<sup>2+</sup>. A. Immunodétection avec un anticorps anti-phosphotyrosine. B. Coloration de la membrane utilisée pour l'immunodétection au bleu de Coomassie.

Nous ne pouvons pas exclure la présence nécessaire d'un tiers pour qu'UbK puisse réaliser cette phosphorylation. Nous avons donc évalué la phosphorylation d'AsnS D121Y *in vivo*. Bien qu'*asnS* soit un gène essentiel, la mutation *asnS* D121Y est tolérée *in vivo* et n'impacte pas, au même titre que la mutation suppressive, la croissance du pneumocoque (Figure 51).

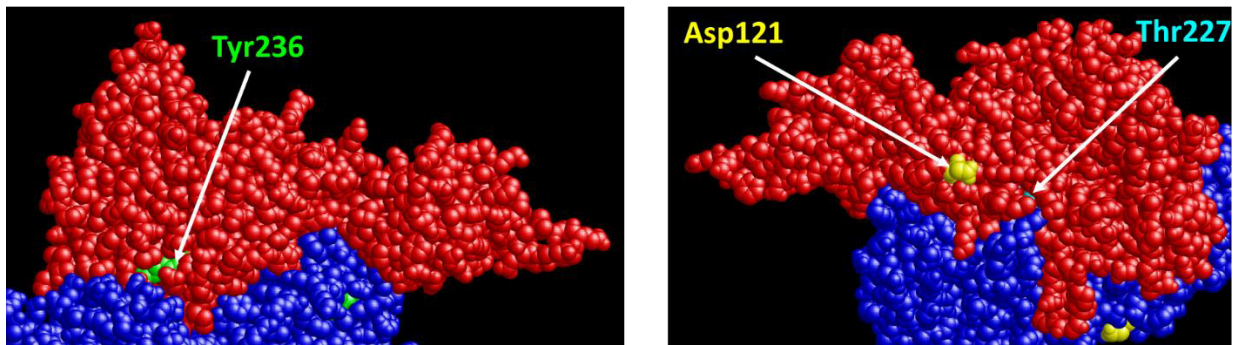




**Figure 51 : Courbes de croissance de mutants d'*ubk* et d'*asnS* de *S. pneumoniae*.** Les courbes de croissance des souches sauvage,  $\Delta ubk$ , produisant AsnS D121A et AsnS D121Y sont en bleu, rouge, violet et turquoise respectivement. Les temps de génération, correspondant au temps de doublement de la population, sont présentés pour chaque souche dans le tableau. Cette expérience est représentative de manipulations réalisées en triplicat.

Nous avons généré une version d'AsnS D121Y couplée à une étiquette « flag » au locus chromosomique d'*asnS* et réalisé une immunoprécipitation. De la même manière qu'avec la fusion GFP, nous estimons que la fusion d'AsnS avec le flag est fonctionnelle, ou tout au moins l'est suffisamment, pour assurer la viabilité du pneumocoque. Puisque les niveaux de phosphorylation d'AsnS pourraient être très bas et peut-être non détectés par des anticorps, nous avons analysé la phosphorylation de Flag-AsnS D121Y par spectrométrie de masse, en collaboration avec le centre de protéomique de Tübingen en Allemagne. Malgré plusieurs types de digestions enzymatiques, le peptide contenant la Tyrosine 121 n'a pas été couvert. Nous n'avons donc pas pu conclure sur une éventuelle phosphorylation de la Tyrosine 121. Cependant, d'autres sites de phosphorylation ont été identifiés : la Thréonine 227 et le Tyrosine 236. UbK appartient à une nouvelle famille de protéine-kinases dont les acides-aminés phosphorylés diffèrent en fonction des espèces bactériennes. Son homologue chez *B. subtilis*, YdiB, s'autophosphoryle sur la Sérine/Thréonine et dans une moindre mesure sur la Tyrosine, même si les sites n'ont pas été identifiés, et phosphoryle des substrats sur la Sérine/Thréonine *in vitro* (Nguyen et al., 2017). De plus, à l'heure actuelle, aucun substrat d'UbK n'a été identifié *in vivo* permettant de conclure qu'UbK phosphoryle exclusivement les Tyrosines de protéines-substrats. Nous pouvons donc envisager qu'UbK de *S. pneumoniae* soit en mesure de phosphoryler également les Sérines et les Thréonines des protéines-substrats.

Nous avons utilisé le modèle généré pour AsnS pour situer les résidus retrouvés phosphorylés en spectrométrie de masse (Figure 52). La Thr227 et la Tyr236 ne semblent pas retrouvés en surface de la protéine AsnS. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que ce modèle ne reflète pas entièrement l'exposition exacte de ces résidus et/ou qu'AsnS puisse changer de conformation afin de les rendre accessibles pour être phosphorylés.



**Figure 52 : Visualisation des sites de phosphorylation potentiels d'AsnS chez *S. pneumoniae*.** Chaque monomère d'AsnS est représenté en rouge et en bleu, et les sites de phosphorylation identifiés par spectrométrie de masse visibles en vert pour la Tyrosine 236 et en turquoise pour la Thréonine 227, par rapport à la position de l'Aspartate 121 en jaune.

D'après nos résultats, AsnS ne semble donc n'être ni un substrat ni un partenaire d'UbK. De par l'apparition de la mutation en Alanine dans *asnS* en absence d'*ubk*, nous avons émis l'hypothèse qu'AsnS aurait pu être un substrat d'UbK qui aurait évolué pour s'affranchir du contrôle par phosphorylation. Cette hypothèse reste toujours possible puisque le peptide comprenant la mutation D121Y n'a pas été couvert en spectrométrie de masse. Cependant, l'étude de la phosphorylation d'AsnS par spectrométrie de masse nous a fourni des pistes qui pourraient être intéressantes pour comprendre le lien fonctionnel entre AsnS et UbK.

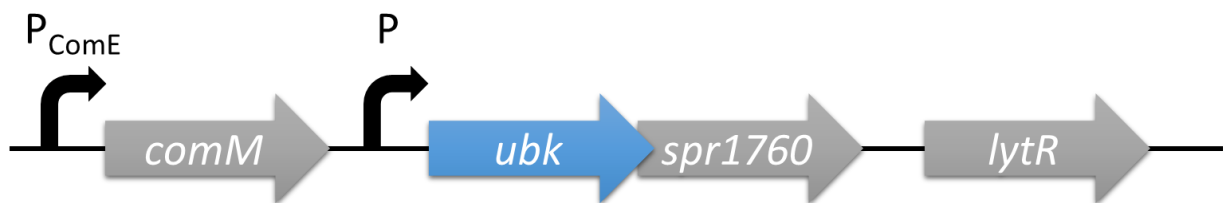
### III. Recherche de partenaires/substrats d'UbK

Dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires conduisant aux défauts de croissance et de morphologie en absence d'*ubk*, nous avons recherché des substrats et/ou partenaires d'UbK. L'environnement génétique direct d'*ubk* a constitué la première piste d'investigations.

## 1. L'environnement génétique d'*ubk*

### 1.1. Les gènes de l'opéron *ubk*

*ubk* est localisé dans un opéron, constitué des gènes *comM*, *ubk*, *spr1760* et *lytR* sous contrôle du promoteur de type  $P_{comE}$ , exprimé lors de la phase précoce de la compétence (Figure 53). Des analyses transcriptomiques des gènes induits lors de l'induction de la compétence montrent que l'expression des gènes de l'opéron incluant *ubk*, est augmentée de quatre à huit fois après fixation du régulateur de réponse ComE à son promoteur (Bergé et al., 2017; Dagkessamanskaia et al., 2004; Peterson et al., 2004). De manière intéressante, un autre promoteur, cryptique, est probablement présent dans cet opéron en amont d'*ubk* afin de permettre l'expression basale des trois gènes en aval de *comM* (Havarstein et al., 2006).



**Figure 53 : Schéma de l'opéron d'*ubk*.** Les différents gènes sont représentés avec des flèches grises ou bleue pour *ubk*. Les promoteurs sont représentés par des flèches noires.

ComM est un facteur d'immunité, exprimé précocement lors de l'induction de la compétence, afin de protéger le pneumocoque de sa propre lyse par l'hydrolase CbpD. Cette dernière est également exprimée lors de la compétence et impliquée dans le phénomène de fratricide (Havarstein et al., 2006). De plus, ComM provoque un arrêt transitoire de la croissance, et plus précisément un délai de la constriction cellulaire lors de l'induction de la compétence. Cet arrêt du cycle cellulaire permet la résolution des dimères de chromosomes éventuellement générés lors de la transformation génétique (Bergé et al., 2017).

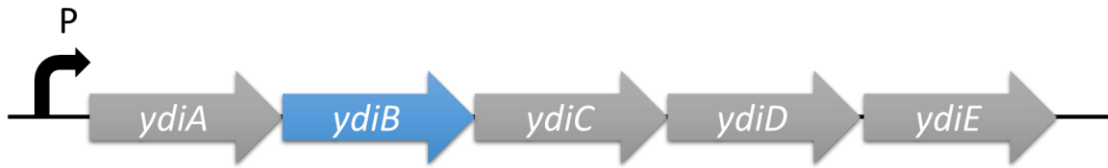
*spr1760* code pour une acétyltransférase présumée, de la superfamille des N-acétyltransférases relatives au contrôle général non répressible GNAT (*General control Non repressible 5-related N-AcetylTransferase*). Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement acyl de l'Acétyl-coA sur un groupement amine primaire de divers substrats. Par exemple, les GNAT peuvent contribuer à la résistance aux antibiotiques en diminuant l'affinité

de l'aminoglycoside acétylée pour le ribosome, ou favoriser la transcription en acétylant les histones. Ces enzymes sont largement retrouvées dans tous les organismes vivants et participent à des rôles multiples (Iftiaf et al., 2016). Son rôle chez le pneumocoque n'est pas établi.

LytR appartient à la famille de protéines LytR-Cps-Psr communément présentes chez les bactéries à Gram-positif. Elles sont impliquées dans l'ancrage des acides téichoïques et des polysaccharides capsulaires au peptidoglycane (Ye et al., 2018). Tout comme *ubk*, *lytR* est considéré comme essentiel, mais des mutants du gène ont été obtenus en présence d'une ou plusieurs mutations suppressives co-occurentes non caractérisées. L'absence de *lytR* dans ces conditions génère l'apparition de multiples septa, suggérant un rôle dans la formation et le positionnement correct du septum de division (Johnsborg & Håvarstein, 2009).

L'environnement génétique proche d'*ubk* de *S. pneumoniae* est singulièrement différent de celui de ses homologues *ydiB* et *yjeE* des bactéries modèles *B. subtilis* et *E. coli* respectivement (Figure 54). Chez *E. coli*, *yjeE* est présumément en opéron avec les protéines codant pour la NAD(P)HX déshydratase YjeF, la N-acétylmuramoyl-L-Alanine amidase YdiD (*amiB*), la protéine de réparation des mésappariements de l'ADN *mutL* et l'ARNt diméthylallyltransférase *miaA*. Chez *B. subtilis*, *ydiB* est en opéron avec les protéines qui codent pour la thiamine-monophosphosphate kinase YdiA, la N-acétyltransférase de protéine ribosomale-Alanine présumée YdiD, et des protéines YdiC et YdiE impliquées dans la biosynthèse d'une base modifiée de l'ARNt thréonylcarbamoyladénosine t<sup>6</sup>A. Les protéines de la famille UbK possèdent donc un environnement génétique différent entre les espèces bactériennes, suggérant un rôle propre à chaque bactérie. De manière intéressante, les protéines YeaZ et YgjD interagissent avec YjeE et sont impliquées dans la modification du t<sup>6</sup>A, au même titre que leur homologues YdiBCE chez *B. subtilis* (Deutsch et al., 2012). De manière intéressante, YdiB est capable de phosphoryler YdiE *in vitro* (Nguyen et al., 2017). Nous nous sommes donc intéressés à la relation d'UbK de *S. pneumoniae* avec son environnement génétique.

### *B. subtilis*

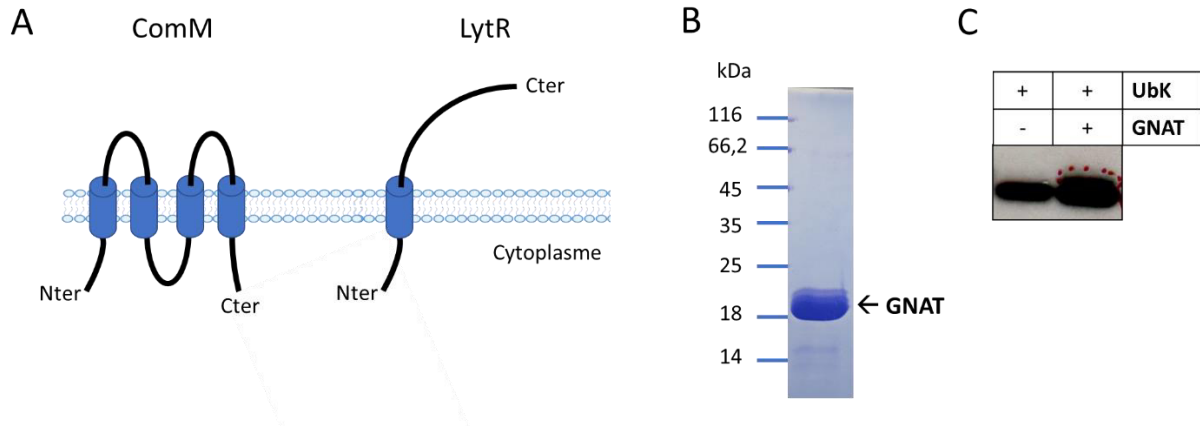


### *E. coli*



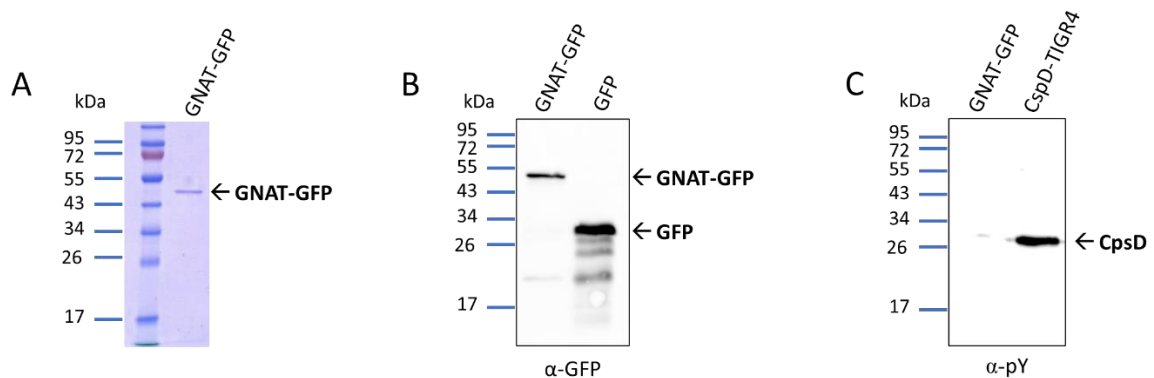
**Figure 54 : Environnement génétique des gènes de la famille UbK chez *B. subtilis* et *E. coli*.** Les promoteurs de chaque opéron sont représentés avec une flèche noire et un P au-dessus. Les différents gènes sont indiqués par des flèches grises, et bleues pour les gènes de la famille UbK.

Des prédictions de structure avec le logiciel « topcons » indiquent que ComM est une protéine membranaire possédant quatre segments membranaires et que ses extrémités N-terminale et C-terminale sont cytoplasmiques. LytR est une protéine avec un simple passage transmembranaire et une courte extrémité N-terminale cytoplasmique (Figure 55A). La protéine GNAT est prédite comme étant cytoplasmique, tout comme UbK. Des études au laboratoire de la phosphorylation de LytR dans des extraits membranaires n'a pas montré de signal de phosphorylation par UbK *in vitro* en présence d'ATP radioactif. La purification de ComM n'a pas été fructueuse. Nous nous sommes donc intéressés à la phosphorylation de la protéine cytoplasmique GNAT par UbK *in vitro* (Figure 55B et C). Comme nous l'avons auparavant démontré, UbK est effectivement autophosphorylée (Figure 55C). En présence d'UbK et de GNAT, nous détectons un signal de phosphorylation plus intense, correspondant à la GNAT phosphorylée, de taille similaire à UbK. GNAT est donc phosphorylée par UbK *in vitro*.



**Figure 55 : Etude de la phosphorylation des protéines de l'opéron *ubk*.** A. Prédiction de la topologie des protéines membranaires ComM et LytR par le logiciel « topcons ». ComM possède ses parties N-terminale et C-terminale cytoplasmiques ainsi que quatre passages transmembranaires. LytR possède un passage transmembranaire avec une petite partie N-terminale cytoplasmique et sa chaîne principale à l'extérieur de la cellule. B. Protéine GNAT purifiée sur gel SDS-PAGE. C. Test de phosphorylation *in vitro* de GNAT par UbK. Autoradiographie d'UbK et GNAT qui ont été incubées pendant 20 min à 37°C en présence de  $^{32}\text{P}$ -ATP et de  $\text{Mg}^{2+}$ .

Pour confirmer ce résultat *in vivo*, nous avons construit une souche dans laquelle le gène *gnat* est fusionné au gène *gfp* au locus chromosomique. La séquence en 5' du gène de *gnat* se superpose partiellement avec celle d'*ubk* en 3'. Nous avons donc privilégié la fusion d'une étiquette à l'extrémité C-terminale de GNAT (Figure 53). Après purification par immunoprécipitation de GNAT-GFP à l'aide d'anticorps anti-GFP, nous n'avons pas détecté de signal de phosphorylation de GNAT-GFP après immunodétection avec un anticorps anti-phosphotyrosine (Figure 56). Cette observation a été confirmée par spectrométrie de masse. Ainsi, GNAT ne semble pas être un substrat d'UbK *in vivo*.



**Figure 56 : Immunoprécipitation de GNAT-GFP.** A. SDS-PAGE de GNAT-GFP purifié *via* son étiquette GFP. B. Immunodétection de l'immunoprécipitation de GNAT-GFP avec un anticorps anti-GFP ( $\alpha$ -GFP). C. Immunodétection de l'immunoprécipitation de GNAT-GFP avec un anticorps anti-phosphotyrosine ( $\alpha$ -pY). La protéine purifiée CpsD sert de témoin de phosphorylation sur la Tyrosine.

## 1.2. Rôle d'UbK dans la compétence

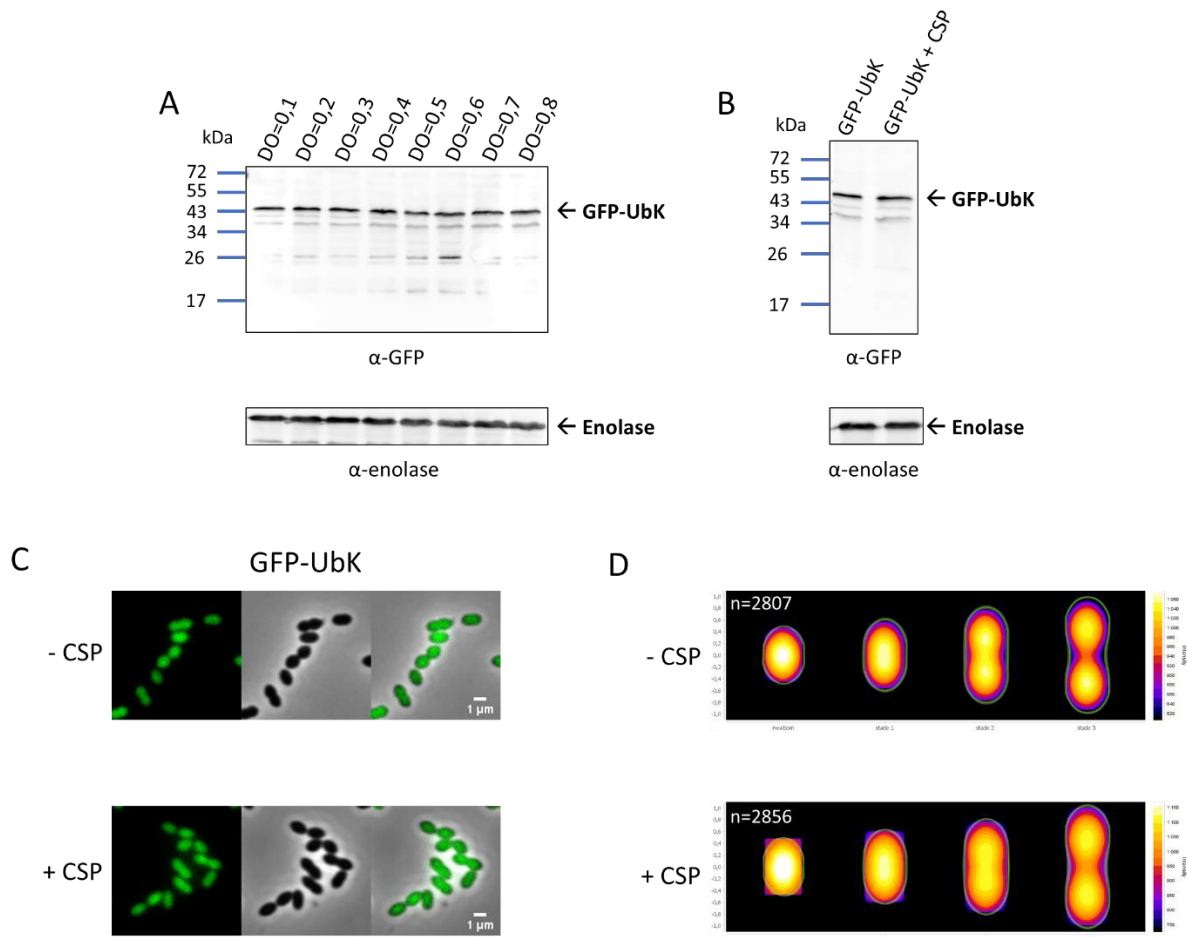
L'opéron auquel appartient *ubk* a été décrit comme étant induit lors de l'induction de la compétence, par l'intermédiaire du promoteur en amont de *comM* qui est reconnu par le régulateur transcriptionnel ComE. La compétence est associée à l'induction de gènes favorisant l'internalisation, l'intégration et la recombinaison d'ADN étranger ayant une importante homologie avec celui du pneumocoque, afin d'acquérir éventuellement de nouvelles propriétés. Le développement de la compétence s'accompagne également de l'induction de nombreux autres gènes, dont les rôles sont inconnus ou qui permettent l'aboutissement de certains phénomènes comme le fratricide (Dagkessamanskaia et al., 2004; Peterson et al., 2004; Salvadori et al., 2019).

### 1.2.1. Expression d'*ubk* lors de la compétence

Dans un premier temps, nous avons évalué l'expression d'*ubk* au cours de la croissance cellulaire. Pour cela, nous avons réalisé une culture de la souche *gfp-ubk* au sein de laquelle nous avons prélevé des cellules à différentes Densités Optiques (DO à 550 nm) afin de réaliser une immunodétection de GFP-UbK avec un anticorps anti-GFP sur des extraits totaux (Figure 57A). L'expression d'*ubk* s'avère constante en fonction de la croissance, en accord avec la présence d'un promoteur cryptique qui permet certainement une expression constitutive basale (Figure 53).

Afin d'évaluer la production d'UbK lors de l'induction de la compétence, nous avons utilisé la forme maturée du peptide synthétique CSP qui stimule son développement. La compétence naturelle se déclenche spontanément à  $DO_{550nm}=0.1$ , densité optique à laquelle se développe spontanément la compétence naturelle. Elle peut être inhibée par abaissement du pH du milieu à 6.8. Ainsi, à  $DO_{550nm}=0.1$  dans un milieu à pH=6.8, nous ajoutons du CSP à concentration saturante pour déclencher la compétence. Nous avons analysé 20 min plus tard l'expression de GFP-UbK avec un anticorps anti-GFP sur des extraits totaux (Figure 57B). En effet, *ubk* semble induite précocement en compétence, tout comme ComX. Il est décrit dans la littérature que toutes les cellules sont capables de devenir compétentes dans une fenêtre

de 30 min après induction au CSP. L'étude de la cinétique de la compétence à l'aide de rapporteurs comme la luciférase et la GFP sous le contrôle du promoteur  $P_{comX}$ , montre un maximum aux alentours de 20 min (Bergé et al., 2017). Nous avons donc choisi un temps de 20 min après mise en contact avec le CSP.



**Figure 57 : Expression d'*ubk* au cours du cycle cellulaire.** A. Immunoblot avec des anticorps anti-GFP ( $\alpha$ -GFP) et anti-énolase ( $\alpha$ -énolase) sur des extraits totaux de la souche produisant GFP-UbK à différentes DO à 550 nm. La quantité d'extrait brut déposée est corrélée à avec l'expression constante d'énolase. B. Immunoblot avec des anticorps anti-GFP ( $\alpha$ -GFP) et anti-énolase ( $\alpha$ -énolase) sur des extraits totaux de la souche produisant GFP-UbK induite ou non avec du CSP à  $DO_{550nm}=0.1$ . La quantité d'extrait brut déposée est corrélée à avec l'expression constante d'énolase. C. Microscopie à contraste de phase et à fluorescence de la souche *gfp-ubk* induit par du CSP. La localisation de GFP-UbK est cytoplasmique quelles que soient les conditions. D. Analyse avec le logiciel MicrobeJ de la fluorescence de GFP-UbK lors de l'induction par du CSP. La fluorescence de GFP-UbK est représentée dans les différents types cellulaires, qui correspondent à l'évolution de l'état de division du pneumocoque. L'intensité du signal s'échelonne du violet foncé au blanc, traduisant des signaux faible et fort respectivement. Le nombre de cellules totales analysées est indiqué (n=X).

Nous n'observons pas de différence d'expression de GFP-UbK en condition ou non de compétence. Ces résultats ne reflètent pas ce qui est décrit dans la littérature selon lequel



l'opéron contenant *ubk* est induit transcriptionnellement en compétence, et notamment *lytR* dont l'ARNm (ARN messager) a été quantifié par qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcription – PCR*) (Bergé et al., 2017). Il est à noter que la phosphorylation d'UbK *in vivo* n'est pas détectée dans des extraits totaux mais seulement lorsqu'elle est enrichie, ce qui semble en faveur d'une faible expression d'*ubk*. Ainsi, la différence d'expression en condition d'induction en compétence n'est peut-être tout simplement pas détectée par immunodétection. La présence de l'étiquette GFP pourrait en revanche stabiliser la protéine de fusion GFP-UbK, de sorte que l'induction au CSP génère une augmentation de la quantité d'UbK non significative parmi les protéines accumulées et/ou non dégradées jusqu'à l'induction de la compétence.

Nous avons voulu voir si la localisation cytoplasmique d'UbK (voir article partie A des résultats) était affectée en condition d'induction de la compétence. Certaines protéines montrent une localisation spécifique lors du développement de la compétence. C'est le cas par exemple de ComM dont le gène se situe dans le même opéron qu'*ubk*. ComM est une protéine membranaire qui localise spécifiquement au septum lors de l'induction de la compétence (Bergé et al., 2017). De la même manière, EndA, une endonucléase responsable de la dégradation d'un des deux brins de l'ADN susceptible d'être transformé, et qui appartient à la machinerie du transformasome, voit sa localisation uniformément membranaire devenir septale en condition de compétence (Bergé et al., 2013). Nous avons donc suivi la localisation et la dynamique de GFP-UbK en présence ou en absence de CSP (Figure 57C et D). Afin d'étudier la dynamique de la localisation, nous avons utilisé le logiciel MicrobeJ pour quantifier la fluorescence des cellules et générer une carte de chaleur en fonction des différentes étapes de la division cellulaire. Nous observons une localisation d'UbK qui demeure cytoplasmique tout au long du cycle cellulaire, indépendamment de l'induction au CSP, et donc en compétence.

### 1.2.2. Fonctionnalité de la compétence en absence d'*ubk*

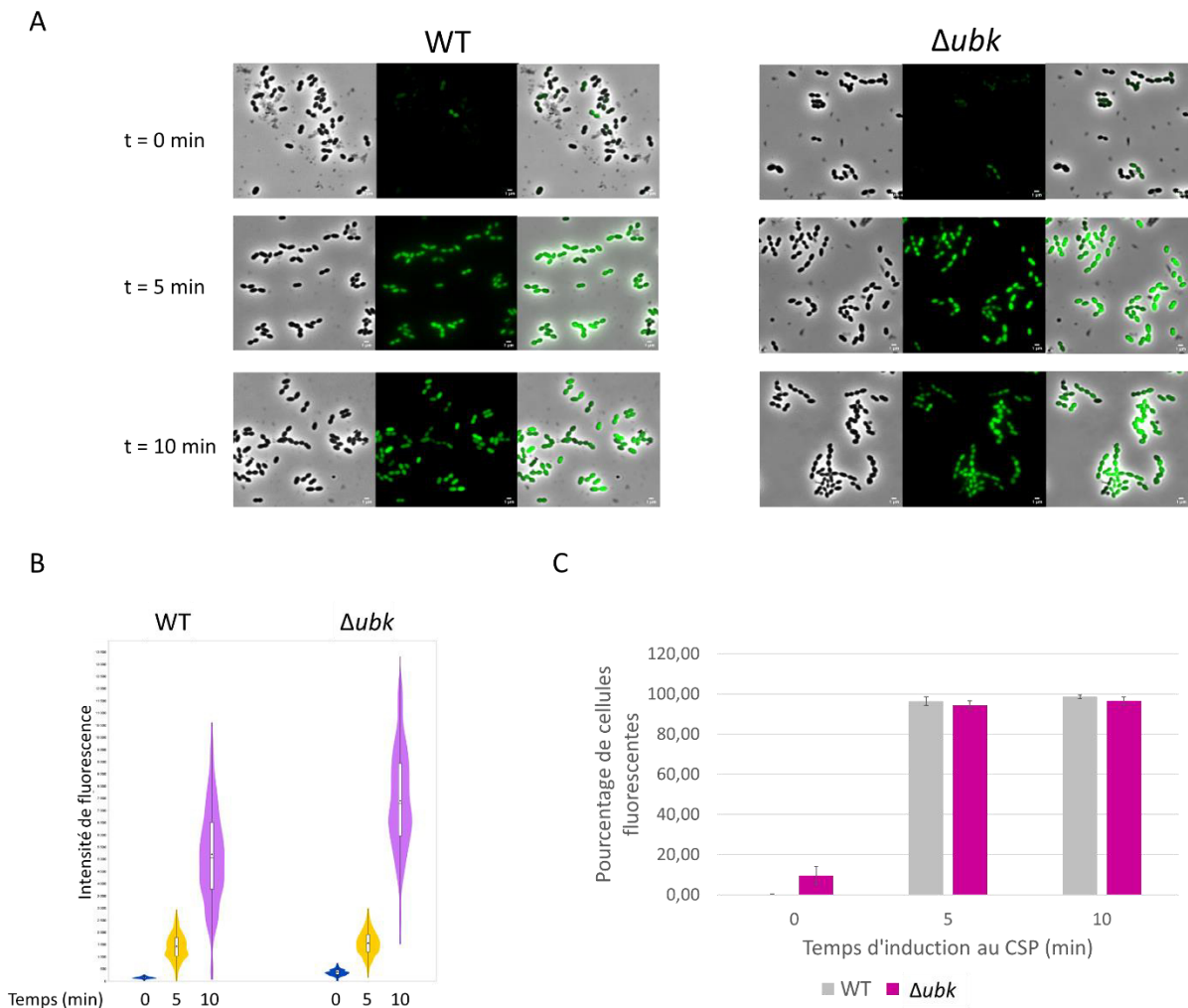
La compétence se déroule en deux phases. Une phase précoce correspond à la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positive avec production du peptide inducteur CSP.

Elle implique l'induction de la transcription des gènes dits précoces, dont le gène *comM*, facteur d'immunité protégeant les cellules compétentes du fratricide. Les gènes tardifs sont ensuite exprimés, permettant l'internalisation d'ADN exogène dans la cellule et son intégration éventuelle au génome, par recombinaison homologue. D'autres gènes, par exemple ceux du fratricide, sont également exprimés à ce stade. L'état physiologique de compétence dure environ 30 min, comprenant la phase précoce dans les dix premières minutes, et la phase tardive les vingt suivantes.

Afin d'étudier le rôle d'UbK dans la compétence, nous avons indépendamment utilisé le gène *gfp* comme rapporteur transcriptionnel auquel sont fusionnés des promoteurs de gènes des phases précoce et tardive, en l'occurrence *comE* et *ssbB* respectivement. ComE est le régulateur de réponse du TCS activé par l'Histidine kinase ComD en réponse au CSP, capable de diriger l'activation des gènes précoces de la compétence par reconnaissance de boîtes *comE* en amont de ces gènes. *ssbB* est induit tardivement lors de la compétence. Les protéines SsbB interagissent avec l'ADN simple brin internalisé pour le protéger des nucléases cellulaires, avant son intégration dans le génome.

Nous avons intégré la construction  $P_{comE}\text{-}gfp$  dans une souche  $\Delta ubk$ , puis mesuré la fluorescence émise par la GFP en fonction du temps après ajout de CSP dans un milieu à pH=6.8, réprimant le développement spontané de la compétence. Malgré une hétérogénéité de l'intensité du signal, auparavant observée dans la littérature et traduisant une variation du niveau d'expression (Figure 58A), les cellules deviennent toutes fluorescentes dès 5 min (Bergé et al., 2017). Les observations sont similaires pour la souche  $\Delta ubk$  malgré la présence de cellules de forme anormales liées à l'absence d'*ubk*. Nous avons effectué une mesure cinétique de l'intensité de fluorescence des cellules dans ces différentes conditions en utilisant MicrobeJ. Le signal augmente significativement en fonction du temps et de manière similaire qu'UbK soit exprimée ou non (Figure 58B). Nous observons un signal de fluorescence plus intense pour les cellules  $\Delta ubk$  à 10 min. Cependant, nous attribuons ce résultat à un artefact issu de l'hétérogénéité de fluorescence des cellules, puisque nous retrouvons des variations d'intensité de fluorescence sur des expériences indépendantes. De ce fait, nous avons déterminé un seuil pour lesquelles les cellules sont fluorescentes, et ainsi obtenu un pourcentage de cellules compétentes à chaque temps. Le signal à t=0 min correspond à l'auto-fluorescence des cellules. Dès 5 min d'induction au CSP, presque la totalité des cellules sont

induites précocement en compétence (Figure 58C). L'absence d'*ubk* ne semble donc pas avoir d'impact sur le développement de la compétence précoce.

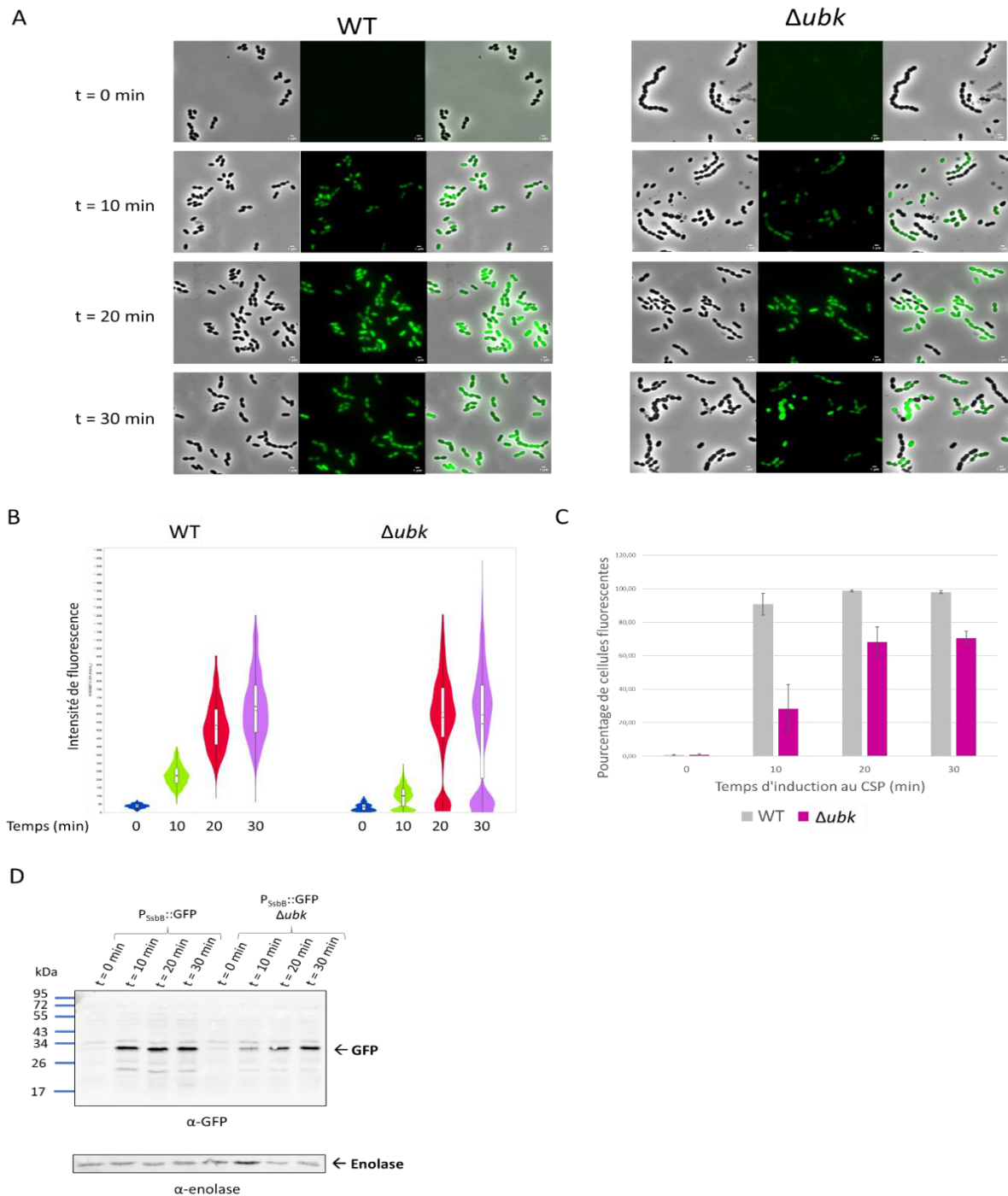


**Figure 58 : Induction de la compétence précoce d'une souche *Δubk*.** A. Microscopie à contraste de phase et à fluorescence d'une souche sauvage et d'une souche *Δubk* exprimant  $P_{comE}$ -*gfp* induites au CSP à différents temps après l'induction. B. Violin plot réalisé avec le logiciel MicrobeJ de la distribution cellulaire de l'intensité de fluorescence corrigée par rapport au bruit de fond des souches induites au CSP de 0 à 10 min. La boîte à moustache représente de bas en haut le premier quartile et le troisième quartile, avec au milieu la médiane. Le point dans la boîte correspond à la moyenne. Les traits de part et d'autre de la boîte à moustache déterminent le minimum en bas et le maximum en haut. C. Histogramme du pourcentage de cellules fluorescentes (compétentes) en fonction du temps après induction par le CSP pour la souche WT (en gris) et *Δubk* (en rose) avec les barres d'erreur. Cette expérience est représentative des triplicats réalisés.

De la même manière, la construction  $P_{ssbB}$ -*gfp* a été intégrée dans les souches WT et *Δubk* afin d'évaluer la fluorescence après ajout du CSP. Dès 10 min, nous pouvons commencer

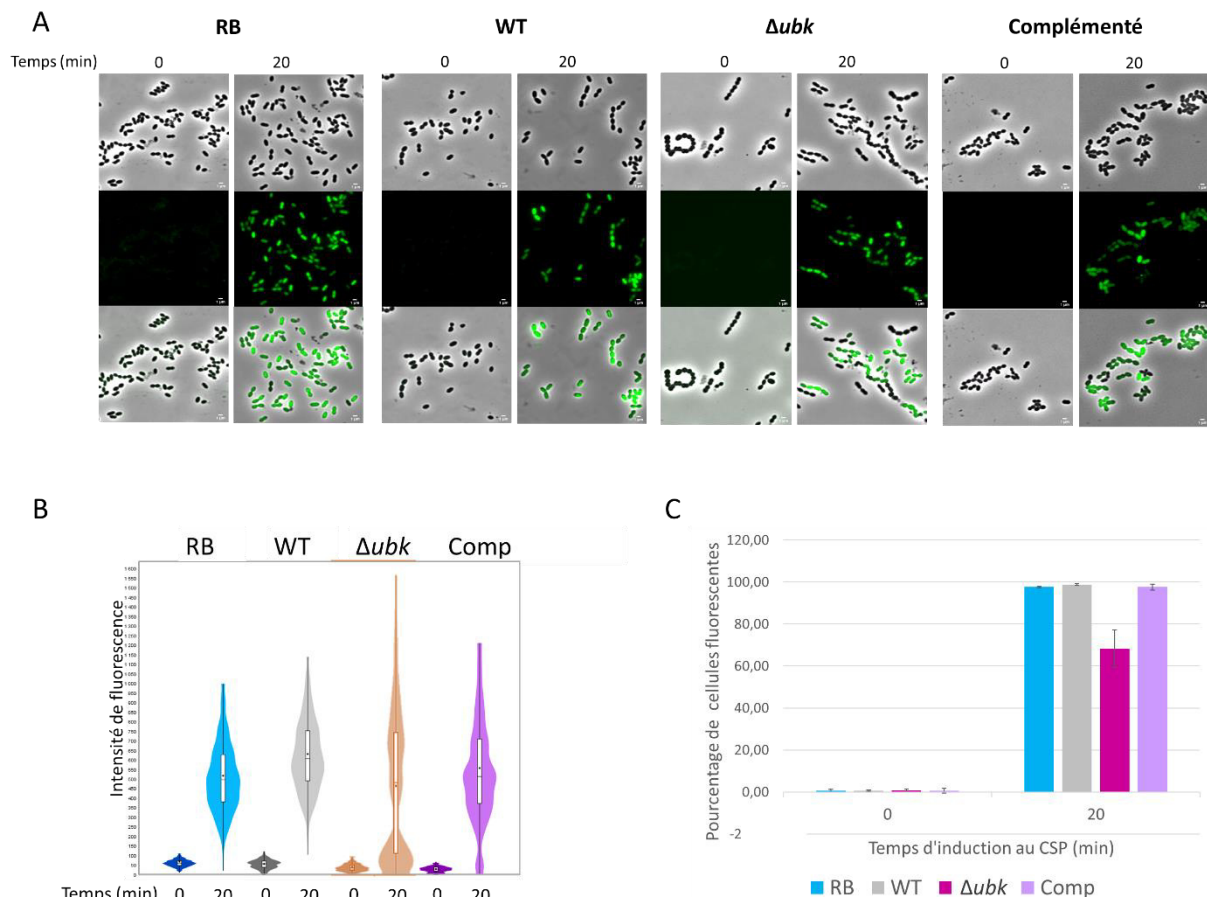
à observer des cellules fluorescentes, traduisant le développement de la compétence tardive (Figure 59A). Elle est pleinement atteinte à 20 min, avec un signal cependant hétérogène en termes d'intensité. Les cellules ne produisant plus UbK montrent clairement une double population de cellules fluorescentes et non fluorescentes malgré la présence du CSP en concentration saturante (Figure 59A). Il est important de distinguer ce cas de figure de l'hétérogénéité de signal observée pour la souche WT, pour laquelle toutes les cellules montrent une fluorescence dont l'intensité peut être variable. L'analyse à l'aide de MicrobeJ montre une double population de cellules fluorescentes et non fluorescentes sur le « violin plot », contrairement aux cellules WT (Figure 59B). Le pourcentage de cellules induites tardivement en compétence est proche de 100% à 20 min pour la souche sauvage. En absence d'*ubk* cependant, nous n'obtenons que 70% des cellules capables d'entrer dans la phase tardive de la compétence à 20 min (Figure 59C). Cette valeur reflète cet état de double population visible sur les images de microscopie et sur l'analyse de l'intensité de fluorescence en fonction du temps. De plus, les 30% de cellules non compétentes à 20 min ne le sont pas non plus à 30 min. Ces résultats sont appuyés par l'étude de l'expression de la GFP sous le contrôle de  $P_{ssbB}$  révélée avec un anticorps spécifique. Elle est effectivement moins importante en absence d'*ubk*, en accord avec ce qui a été observé (Figure 59D). L'absence d'*ubk*, dont le gène appartient à un opéron précoce de la compétence, impacte donc le développement de la compétence tardive.

Afin de s'assurer que cet effet est bien dû à l'absence d'*ubk* et pas à un effet polaire de la délétion d'*ubk*, nous avons utilisé une souche dans laquelle l'expression d'*ubk* est contrôlée *via* une plateforme ectopique inductible afin de compléter l'absence d'UbK. Comme la délétion d'*ubk* avait conduit à l'apparition d'une mutation suppressive dans *asnS*, nous avons également vérifié la restauration d'un phénotype sauvage dans un mutant « réparé » pour UbK (RB pour Repair Back) dans lequel la copie d'*ubk* a été réintroduite à son locus originel. Nous avons mesuré la fluorescence provenant de  $P_{ssbB}$ -*gfp* de ces souches en microscopie, induites par du CSP pendant 20 min. L'ensemble des cellules de la souche « réparée » (et donc exprimant AsnS D121A) présente une fluorescence cytoplasmique, avec un pourcentage de cellules compétentes similaire au WT (Figure 60). De la même manière, la souche complétée (Comp) restaure la fluorescence de la quasi-totalité des cellules, avec une nette atténuation de la double population visible sur le « violin plot » (Figure 60B et C).



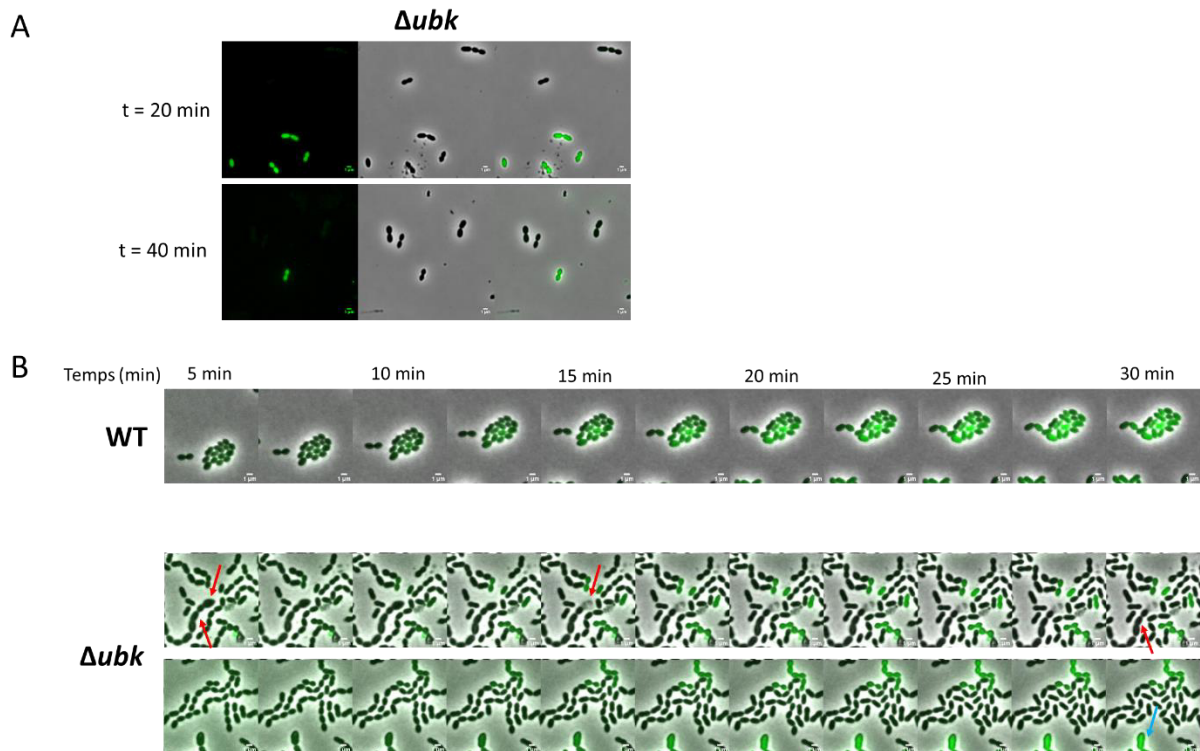
**Figure 59 : Induction de la compétence tardive d'une souche  $\Delta ubk$ .** A. Microscopie à contraste de phase et à fluorescence de souches sauvage et  $\Delta ubk$  exprimant  $P_{ssbB}$ -*gfp*, induites par du CSP après différents temps. B. Violin plot réalisé avec le logiciel MicrobeJ de la distribution cellulaire de l'intensité de fluorescence corrigée par rapport au bruit de fond, des souches induites au CSP, de 0 à 30 min. La boîte à moustache représente de bas en haut le premier quartile et le troisième quartile, avec au milieu la médiane. Le point dans la boîte correspond à la moyenne. Les traits de part et d'autre de la boîte à moustache déterminent le minimum en bas et le maximum en haut. C. Histogramme du pourcentage de cellules fluorescentes (compétentes) en fonction du temps pour les souches WT (en gris) et  $\Delta ubk$  (en rose) avec les barres d'erreur. D. Expression de la GFP induite lors de la compétence en fonction du temps. Immunoblot avec un anticorps anti-GFP ( $\alpha$ -GFP) et anti-énolase ( $\alpha$ -énolase) à différents temps après induction par le CSP. Cette expérience est représentative des triplicats.

L'absence de cellules possédant des défauts morphologiques témoigne également de l'efficacité de la complémentation de  $\Delta ubk$  (Figure 60A). Le phénotype de la souche  $\Delta ubk$  est donc bien dépendant d'UbK, et ne provient ni de la mutation suppressive dans *asnS*, ni d'un effet polaire de la délétion d'*ubk*.



**Figure 60 : Complémentation de la souche  $\Delta ubk$  et induction de la compétence tardive.** A. Microscopie à contraste de phase et à fluorescence des souches complémentées pour  $\Delta ubk$ , possédant la mutation suppressive dans *asnS* (RB, en bleu) ou une unique version d'*ubk* présente sur une plateforme d'expression ectopique et inducible (Complémenté ou Comp, en violet), en comparaison avec les souches sauvage et  $\Delta ubk$  contenant  $P_{ssbB}$ -*gfp* induites par du CSP après différents temps respectivement en gris et rose. B. Violin plot réalisé avec le logiciel MicrobeJ de la distribution cellulaire de l'intensité de fluorescence corrigée par rapport au bruit de fond des souches induites par le CSP de 0 et 20 min. Pour chaque souche, la couleur foncée correspond au t=0 min et la plus claire au t=20 min. La souche RB est représentée en bleu, la WT en vert, la  $\Delta ubk$  en rose et la complémentée en violet. La boîte à moustache représente de bas en haut le premier quartile et le troisième quartile, avec au milieu la médiane. Le point dans la boîte correspond à la moyenne. Les traits de part et d'autre de la boîte à moustache déterminent le minimum en bas et le maximum en haut. C. Histogramme du pourcentage de cellules fluorescentes (compétentes) en fonction du temps pour les souches possédant le même code couleur que sur le violin plot avec les barres d'erreur. Cette expérience est représentative des triplicats réalisés.

Nous avons ensuite vérifié que les cellules  $\Delta ubk$  non induites après 20 min étaient incapables de devenir fluorescentes en augmentant le temps d'induction à 40 min (Figure 61A). Nous pouvons donc exclure que l'absence d'UbK retarde le délai d'induction des gènes tardifs de compétence.



**Figure 61 : Analyse de l'induction de la compétence tardive d'une souche  $\Delta ubk$ .** A. Microscopie à contraste de phase et à fluorescence d'une souche  $P_{ssbB-gfp} \Delta ubk$  induite pendant 20 ou 40 min par du CSP. B. Time-lapse de l'induction de la compétence tardive ( $P_{ssbB-gfp}$ ) d'une souche sauvage et  $\Delta ubk$ . La première image correspond à un temps de 5 min après l'induction initiale au CSP. Chaque cliché suivant correspond à un temps incrémenté de 2.5 min. Les cellules morphologiquement anormales du mutant sont mises en évidence par des flèches ; les cellules non compétentes sont pointées en rouge, alors que les cellules compétentes sont pointées en bleu.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés au phénotype de morphologie cellulaire aberrante de certaines cellules du mutant  $\Delta ubk$  qui pourrait être en lien avec le phénotype observé de compétence tardive réprimée pour une partie de la population cellulaire. Nous avons émis l'hypothèse que les cellules avec une morphologie atypique étaient incapables de développer la compétence tardive. Nous avons réalisé un time-lapse pour suivre l'expression de la GFP dont le gène est sous le contrôle du promoteur de *ssbB* des cellules  $\Delta ubk$ . Nous observons que les cellules de morphologie aberrante sont susceptibles d'induire la compétence tardive (Figure 61B). La forme cellulaire n'est donc pas le critère discriminant

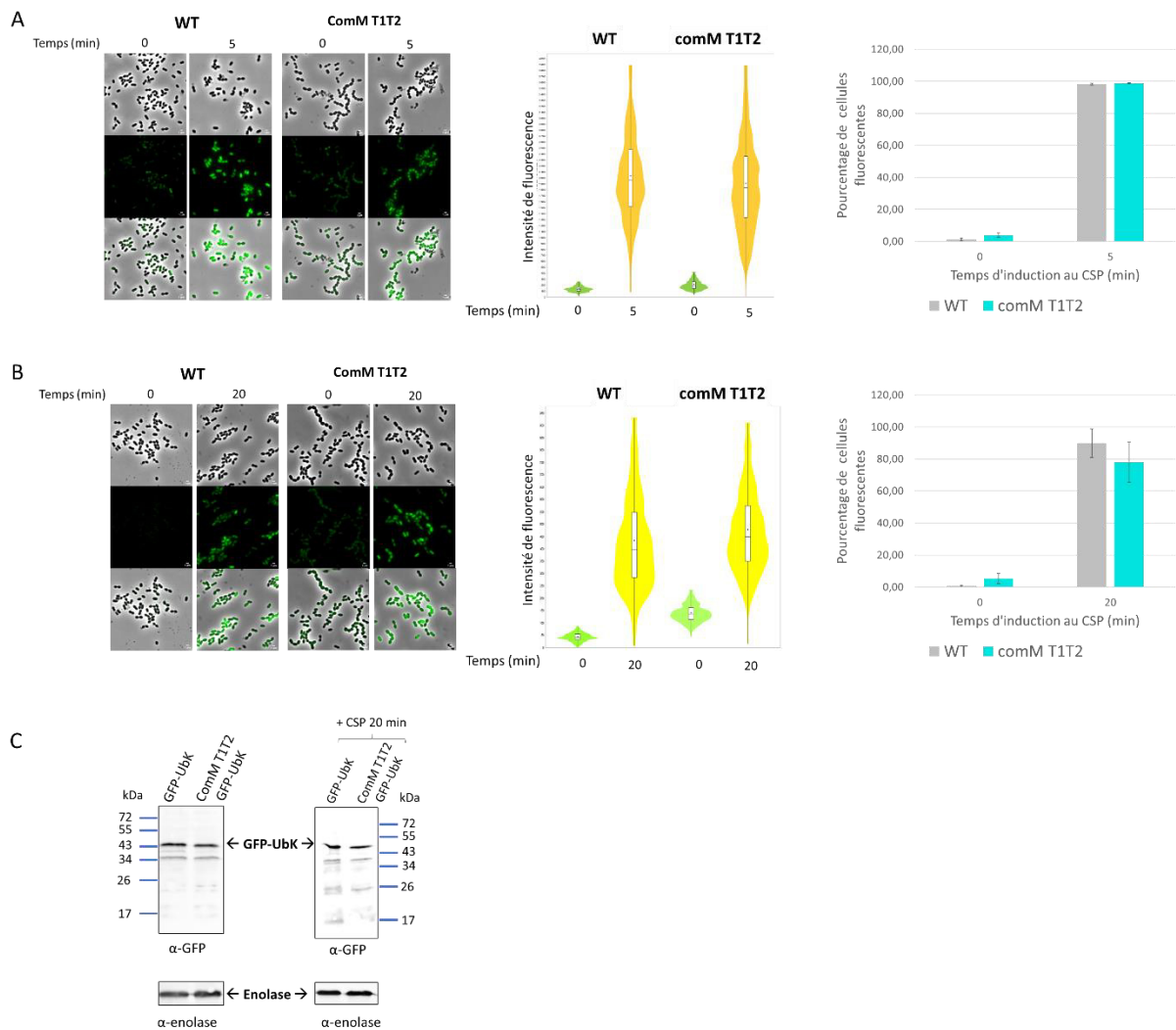
pour le non-développement de la compétence tardive. En revanche, ces cellules subissent une lyse précoce, certainement liée à leurs défauts morphologiques.

Pour déterminer si l'implication d'UbK lors de la phase tardive de la compétence est dépendante de son induction en compétence, nous avons utilisé un outil génétique dans lequel le terminateur fort de la transcription *rrnB*, T1T2, issu d'*E. coli* est positionné juste en aval de *comM*. T1T2 empêche la transcription des gènes *ubk-gnat-lytR* en aval de *comM* dans l'opéron (Bergé et al., 2017). Nous avons construit des souches porteuses du terminateur en aval de *comM*, et exprimant  $P_{comE}$ -*gfp* ou  $P_{ssbB}$ -*gfp* pour évaluer la compétence précoce et tardive respectivement.

Le blocage de la transcription dépendante du promoteur de *comM* des gènes en aval ne compromet pas la capacité des cellules à devenir compétentes puisqu'elles deviennent fluorescentes en présence de CSP (Figure 62A et B). Près de 100% des cellules sont capables de développer la compétence précoce. Cependant, nous observons tardivement (20 min) une légère diminution du pourcentage des cellules compétentes en présence du terminateur T1T2 (Figure 62B). Nous attribuons cette observation à une variabilité expérimentale non significative, corrélée par le fait qu'il est démontré dans la littérature que cette souche possède un profil de compétence similaire à une souche sauvage induite (Bergé et al., 2017). Le rôle joué par UbK sur l'expression des gènes tardifs de la compétence semble donc être indépendant de son induction lors de la compétence.

Pour conforter ce résultat, nous avons évalué l'expression de GFP-UbK en présence ou absence du terminateur et en conditions d'induction de la compétence par du CSP (Figure 62C). *S. pneumoniae* a été cultivé à pH=6.8 afin d'inhiber la compétence spontanée, et l'expression de *gfp-ubk* déterminée sur des extraits totaux avec un anticorps anti-GFP. Nous observons que l'expression constitutive basale de *gfp-ubk* est comparable en présence ou absence du terminateur, indiquant qu'il n'a pas d'effet sur l'expression d'*ubk*. En amont de *comM* se trouve un promoteur reconnu précocement par ComE phosphorylé lors du développement de la compétence. En présence du terminateur en aval de *comM*, l'expression d'*ubk* est inchangée, ce qui est en faveur de l'existence d'un promoteur cryptique en amont d'*ubk*.





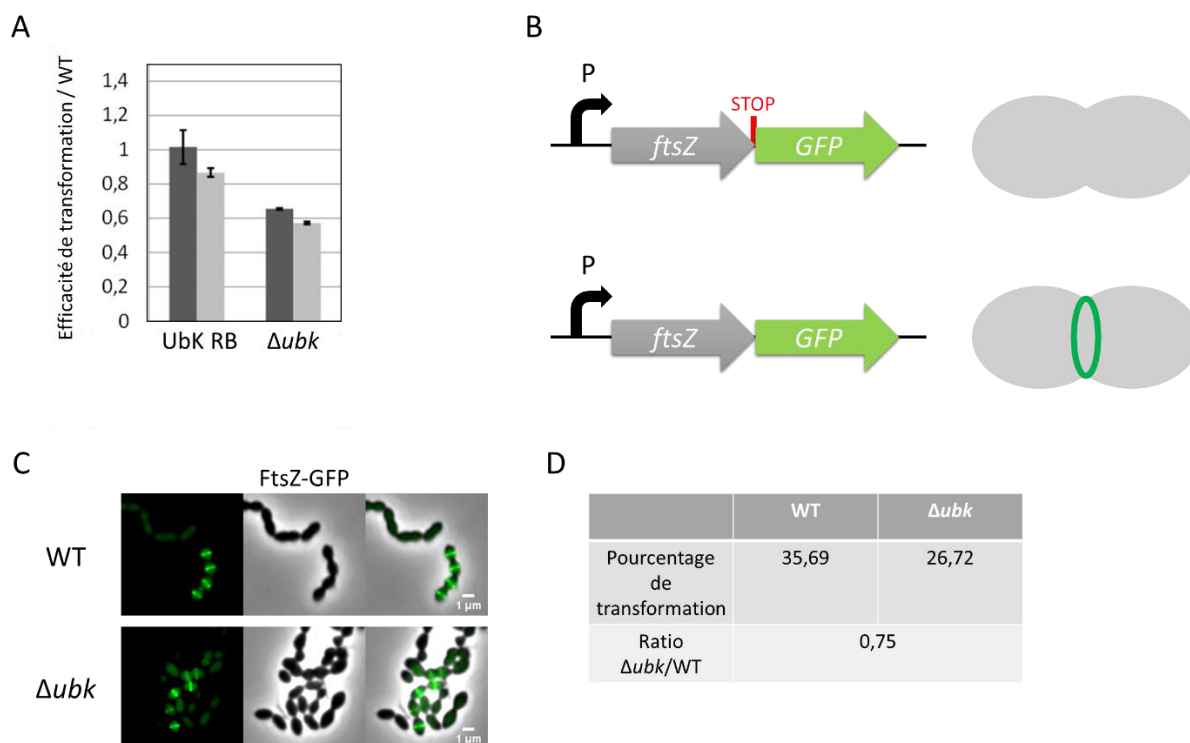
**Figure 62 : Expression de la compétence en présence d'un terminateur de transcription en aval de *comM*.** A. Compétence précoce d'une souche *comM* T1T2  $P_{comE}$ -*gfp* (ComM T1T2) en comparaison avec une souche sauvage WT. Microscopie à contraste de phase et à fluorescence des souches induites par du CSP après 5 min. Violin plot réalisé avec le logiciel MicrobeJ de la distribution cellulaire de l'intensité de fluorescence corrigée par rapport au bruit de fond des souches induites par du CSP pendant 0 et 5 min. Le code couleur montre que le vert correspond à t=0 min et le jaune à t=5 min. La boîte à moustache représente de bas en haut le premier quartile et le troisième quartile, avec au milieu la médiane. Le point dans la boîte correspond à la moyenne. Les traits de part et d'autre de la boîte à moustache déterminent le minimum en bas et le maximum en haut. Histogramme du pourcentage de cellules fluorescentes (compétentes) en fonction du temps pour les souches WT (en gris) et mutante (en turquoise). B. Compétence tardive d'une souche *comM* T1T2  $P_{ssbB}$ -*gfp* (ComM T1T2) en comparaison avec une souche sauvage WT. Microscopie à contraste de phase et à fluorescence des souches induites par du CSP pendant 20 min. Violin plot réalisé avec le logiciel MicrobeJ de la distribution cellulaire de l'intensité de fluorescence corrigée par rapport au bruit de fond des souches induites par du CSP à t 0 et t 20 min. Le code couleur montre que le vert correspond au t=0 min et le jaune à t=5 min. Histogramme du pourcentage de cellules fluorescentes (compétentes) en fonction du temps pour les souches WT (en gris) et mutante (en turquoise). C. Immunodétection de GFP-UbK avec un anticorps anti-GFP ( $\alpha$ -GFP) et de l'énolase avec un anticorps anti-énolase ( $\alpha$ -énolase) à partir d'extraits totaux de *gfp-ubk* en présence ou en absence du terminateur T1T2 en aval de *comM* et après induction pendant 20 min avec du CSP à  $DO_{550nm}=0.1$ .

L'expression d'UbK en présence de CSP est comparable à son expression sans CSP bien qu'*ubk* soit décrit dans la littérature comme étant induit de quatre à huit fois au niveau transcriptionnel lors de la compétence (Figure 62C) (Bergé et al., 2017; Dagkessamanskaia et al., 2004; Peterson et al., 2004). Dans nos conditions, l'expression d'*ubk* n'est pas modifiée lors de la compétence tardive et le phénotype de double population, exprimant ou pas  $P_{ssbB}$ -*gfp*, est donc indépendant de l'expression d'UbK lors de la compétence.

Pour conclure, l'absence d'*ubk* conduit à une incapacité de 30-40% des cellules à entrer en compétence tardive malgré le déroulement optimal de la compétence précoce. Ce résultat est indépendant de la morphologie anormale de certaines cellules et du retard de croissance du mutant  $\Delta ubk$ , mais également de la mutation suppressive dans *asnS*. Le découplage relatif de la production d'UbK lors de la compétence, par l'intermédiaire d'un terminateur en aval de *comM*, ne montre pas d'effet sur l'efficacité de l'induction de la compétence tardive, suggérant un rôle d'UbK indépendant de son induction lors de la compétence.

### 1.2.3. Rôle d'UbK dans la transformation bactérienne

Nous avons envisagé que le rôle joué par UbK sur le développement de la compétence puisse se répercuter sur la capacité du pneumocoque à intégrer de l'ADN lors de la transformation génétique. En effet, parmi les gènes tardifs induits lors de la compétence, nombre d'entre eux codent des protéines nécessaires à l'internalisation dans l'ADN dans la cellule, ainsi qu'à son intégration au génome du pneumocoque par recombinaison homologue. Nous avons évalué le pourcentage de transformation d'un ADN témoin conférant la résistance à un antibiotique, pour une souche  $\Delta ubk$  et pour une souche complétée exprimant UbK (*ubk* RB), c'est-à-dire possédant uniquement la mutation suppressive dans *asnS*, afin de nous assurer de la neutralité de la mutation suppressive (Figure 63A). Deux ADN témoins différents ont été utilisés indépendamment pour consolider l'expérience. Le taux de transformation de la souche  $\Delta ubk$ , relativement à celui de la souche sauvage, est réduit d'environ 30-40%, alors que la souche RB montre un taux similaire à celui de la souche sauvage. En absence d'UbK, le pneumocoque transforme donc moins efficacement l'ADN.



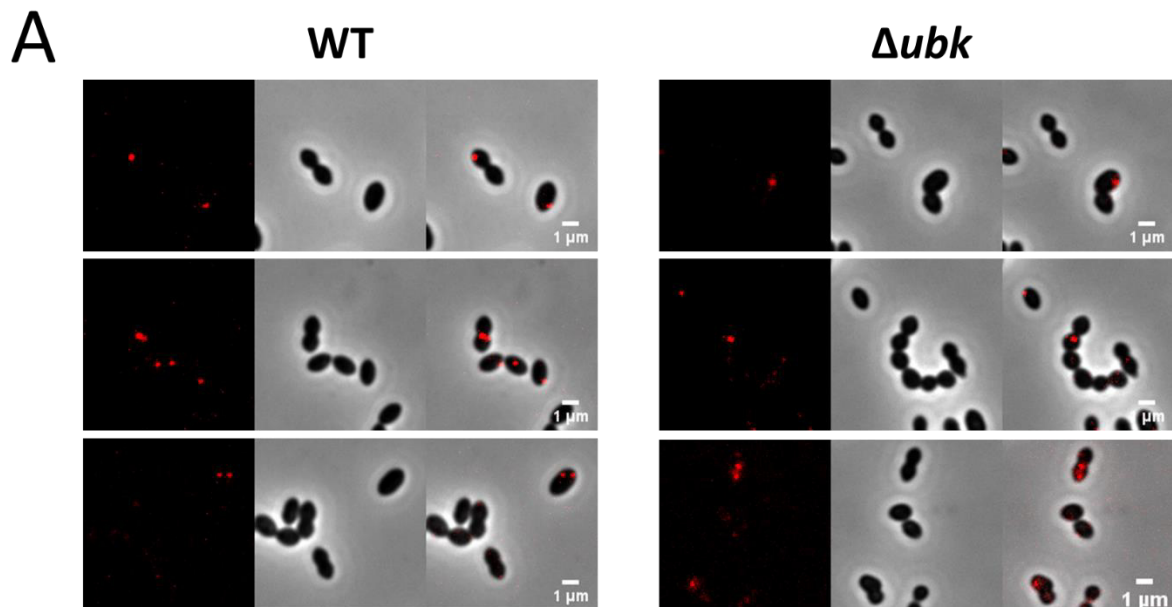
**Figure 63 : Evaluation de la transformabilité du pneumocoque en absence d'*ubk*.** A. Efficacité de transformation par rapport à une souche sauvage (WT). Deux ADN témoins ( $\Delta ubk::kan-rpsL$  et  $\Delta ubk::spc-rpsL$ ) (barres d'histogrammes gris clair et gris foncé) ont été utilisés pour évaluer les pourcentages de transformation d'une souche complétementée pour UbK et donc possédant la mutation AsnS D121A (UbK RB) et n'exprimant pas *ubk* ( $\Delta ubk$ ), par rapport à la souche sauvage. Chaque valeur est une moyenne de trois expériences, et représente le ratio du taux de transformation obtenu par rapport à celui de la souche sauvage (WT) avec les barres d'erreurs. B. Outil génétique d'évaluation de la transformabilité. *ftsZ-GFP*, sous le contrôle de son promoteur P, est traduit en une protéine de fusion dont résulte une fluorescence septale caractéristique de FtsZ. L'introduction d'un codon stop entre les deux séquences codantes fusionnées traductionnellement conduit à l'absence de fluorescence. C. Microscopie à contraste de phase et à fluorescence de FtsZ-GFP dans les souches sauvage (WT) et  $\Delta ubk$ . Le succès de la transformation se traduit par une fluorescence septale de FtsZ. D. Tableau des pourcentages de transformation des souches WT et  $\Delta ubk$ , et ratio des efficacités de transformation entre les deux souches.

Nous avons adopté une seconde méthode afin d'évaluer la transformabilité de la souche directement en microscopie. Pour cela, nous avons utilisé un outil génétique fourni par N. Campo du laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires de l'Université de Toulouse III Paul Sabatier (équipe de P. Polard) (Bergé et al., 2013). Il s'agit d'un ADN donneur, « fourni » aux cellules lors de l'induction de la compétence, et porteur de la fusion *ftsZ-GFP*, susceptible de substituer l'allèle *ftsZ-stop-GFP* au niveau de son locus chromosomique, pour générer une version du gène aboutissant à la production de FtsZ fluorescente (Figure 63B). L'intégration génomique de l'ADN codant pour FtsZ-GFP au moment de la transformation

résulte en la substitution de la séquence codant pour trois acides-aminés autour du stop dans *ftsZ-stop-GFP* afin de générer de la fluorescence, de localisation septale, liée à FtsZ. Nous avons comparé la transformation d'une souche sauvage *ftsZ-stop-GFP* et d'une souche  $\Delta ubk$  *ftsZ-stop-GFP* en comptabilisant les cellules fluorescentes et non fluorescentes par rapport à la population totale (Figure 63C et D). Nous observons pour les deux souches des cellules fluorescentes et non fluorescentes. Pour le mutant  $\Delta ubk$  *ftsZ-stop-GFP*, les défauts morphologiques attendus liés à l'absence d'*ubk* sont visibles (Figure 63C). Le pourcentage de transformation dans une souche sauvage, caractérisé par les cellules avec une fluorescence septale, est d'environ 36%, contre 26% en absence d'*ubk* (Figure 63D). Le ratio de transformants dans les souches  $\Delta ubk$ /WT de 0.75 est cohérent avec les pourcentages de transformation précédemment déterminés (Figure 63A). L'absence d'*ubk* impacte donc la transformation bactérienne, possiblement du fait de l'altération de l'induction de gènes tardifs de la compétence.

Puisque le pneumocoque dépourvu d'*ubk* transforme moins efficacement, nous nous sommes interrogés sur la capacité d'assemblage de sa machinerie de transformation. Elle est normalement composée d'un pilus de transformation reposant sur une plateforme, qui va capter l'ADN au centre de la cellule et l'internaliser (Salvadori et al., 2019). Une éventuelle recombinaison homologue peut ensuite avoir lieu (Johnston et al., 2014). La nucléase membranaire EndA, qui localise au milieu de la cellule, grâce à ComEA, lors de la compétence, permet de suivre la mise en place du transformasome (Bergé et al., 2013). Nous avons intégré la construction *mkate2-endA* au locus génétique original de *endA* dans les souches sauvage et  $\Delta ubk$ , et suivi la localisation de EndA après 10 min d'incubation avec du CSP (Figure 64A). Dans la souche sauvage, EndA forme des foci au milieu de la cellule, c'est-à-dire proche du nucléoïde où se déroule la recombinaison homologue, mais également aux pôles cellulaires où elle est dégradée. Environ 10% des cellules montrent un focus ; la majorité n'en possède qu'un (8%), et certaines deux foci (2%) (Figure 64 A et B). Ce phénomène reflète ce qui est décrit dans la littérature (Bergé et al., 2013). La même chose est observée en absence d'*ubk*, malgré la présence de cellules de forme anormales. Ce résultat est cohérent avec ce qui a été observé lors de la compétence tardive selon lequel l'altération du développement de la compétence tardive était indépendante de la morphologie cellulaire. Le transformasome semble donc

capable de se positionner au milieu de la cellule, même en absence d'UbK. L'identification du(des) gène(s) et/ou des protéines dont les activités sont affectées en absence d'UbK nécessite d'explorer vraisemblablement les étapes ultérieures à la mise en place du pore d'entrée de l'ADN.



**B**

	WT	$\Delta ubk$
Pourcentage de cellules à 1 foci	8,08	7,43
Pourcentage de cellules à 2 foci	1,75	2,15
Pourcentage de cellules total ayant des foci	9,83	9,58
Ratio $\Delta ubk$ /WT	0,97	

**Figure 64 : Localisation de EndA.** A. Microscopie optique à contraste de phase et à fluorescence de *mkate2-endA* en présence (WT) ou en absence d'*ubk* ( $\Delta ubk$ ). Les foci rouges montrent la localisation de *mkate2-EndA*. B. Tableau des pourcentages de cellules WT et  $\Delta ubk$  à 1 ou 2 foci et présentant le ratio du pourcentage de foci entre les deux souches. Les analyses ont été réalisées sur 1312 et 929 cellules WT et  $\Delta ubk$  respectivement.

#### 1.2.4. Compétence et phosphorylation d'UbK

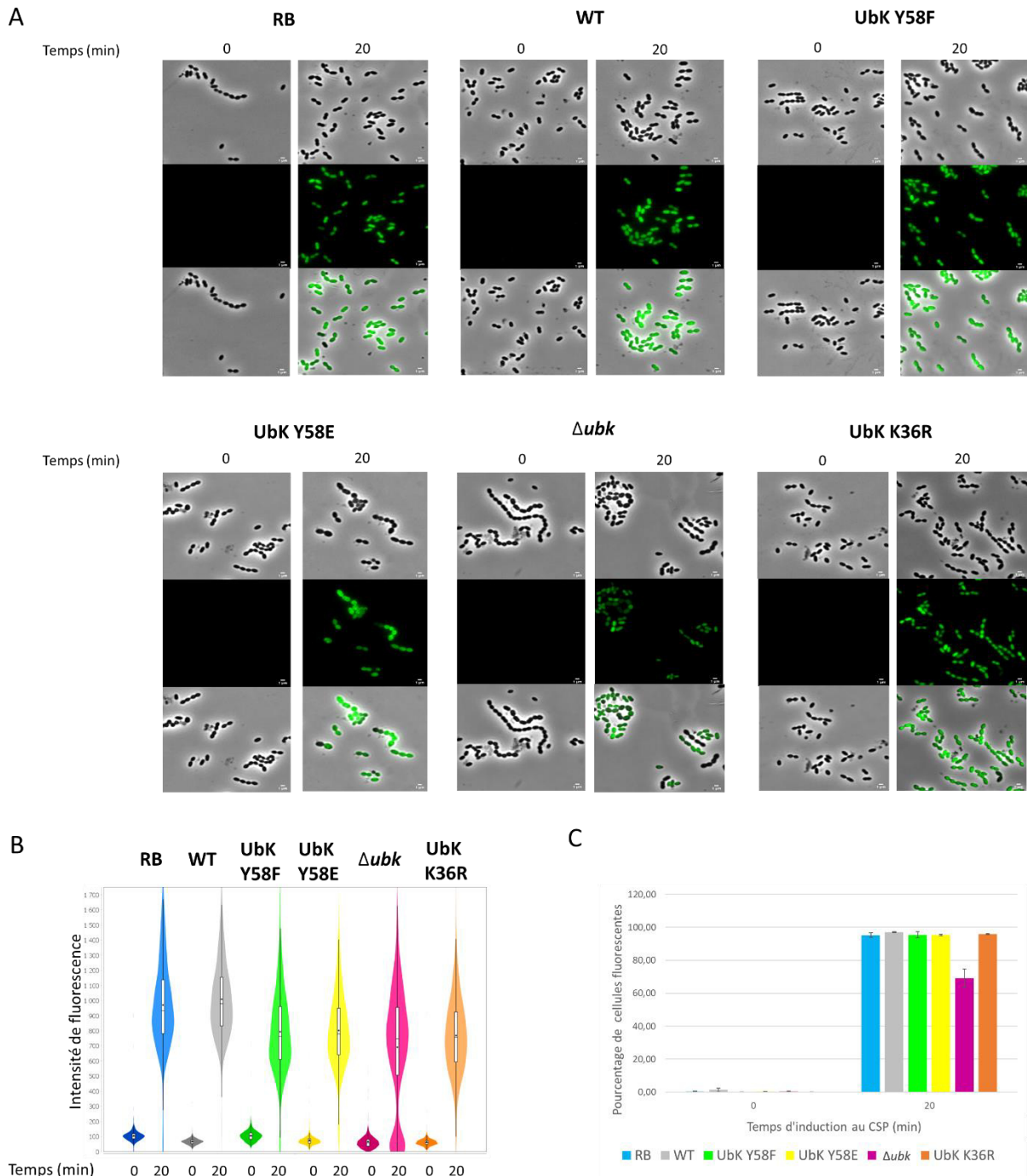
UbK étant une auto-Tyrosine protéine-kinase, nous avons voulu évaluer l'impact de son autophosphorylation sur la compétence.

Nous avons utilisé l'outil  $P_{ssbB-gfp}$  dans les mutants de phosphorylation d'UbK, avec le mutant RB en contrôle, et déterminé le pourcentage de cellules fluorescentes – donc compétentes – 20 min après induction par du CSP dans un milieu supplémenté en HCl afin d'éviter tout déclenchement spontané de la compétence.

Comme il l'a été montré dans la partie I des résultats, UbK est capable de s'autophosphoryler sur une unique Tyrosine en position 58. Nous avons construit des mutants phosphoablatif et phosphomimétique produisant respectivement UbK Y58F et UbK Y58E. Seul *ubk* Y58E montre des défauts de croissance et de morphologie semblables à ceux d'un mutant  $\Delta ubk$ . Par ailleurs, le mutant catalytique *ubk* K36R, pour lequel la Lysine 36 du domaine Walker A impliquée dans la liaison à l'ATP est mutée, montre également un phénotype similaire au mutant  $\Delta ubk$ .

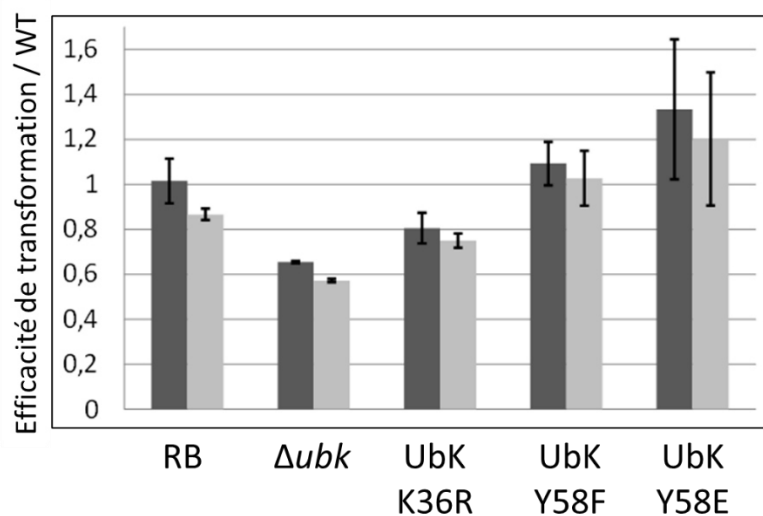
L'absence d'*ubk* montre environ 30% de cellules n'induisant pas  $P_{ssbB-gfp}$  (Figure 59 et 65). La totalité des cellules des mutants de phosphorylation et catalytique (*ubk* Y58F, *ubk* Y58E et *ubk* K36R) est en revanche capable de devenir compétente et d'exprimer  $P_{ssbB-gfp}$  (Figure 65). Ce résultat est surprenant car le mutant phosphomimétique *ubk* Y58E et le mutant catalytique *ubk* K36R présentent des défauts de croissance et de morphologie similaires à ceux du mutant  $\Delta ubk$ . Pour autant, ni l'autophosphorylation, ni l'activité d'hydrolyse de l'ATP d'UbK, ne semblent interférer avec le processus d'induction des gènes tardifs de compétence. Cette observation est en revanche cohérente avec le fait que la double population de cellules induites et non induites d'un mutant  $\Delta ubk$  ne trouve son origine ni dans le délai de croissance lié à l'absence d'*ubk*, ni dans la présence de cellules morphologiquement anormales (Figures 59 et 61). Ces résultats suggèrent donc plutôt que UbK aurait un rôle indépendant de son activité enzymatique lors de la compétence tardive.

Nous avons également déterminé le pourcentage de transformation des mutants d'*ubk* par des ADN porteurs de marqueurs de résistance à des antibiotiques (Figure 66). Le mutant catalytique *ubk* K36R montre une efficacité de transformation réduite d'environ 20% par



**Figure 65 : Développement tardif de la compétence des mutants de phosphorylation et catalytique d'*ubk*.** A. Microscopie à contraste de phase et à fluorescence des souches exprimant  $P_{ssbB}$ -*gfp* 20 min après induction par du CSP. Souches observées : complétement pour *ubk* (RB), sauvage (WT), mutants de phosphorylation phosphoablatif (*ubk* Y58F) et phosphomimétique (*ubk* Y58E),  $\Delta ubk$  et mutant catalytique d'UbK muté dans son domaine Walker A (*ubk* K36R). B. Violin plot réalisé avec le logiciel Microbe J de la distribution cellulaire de l'intensité de fluorescence corrigée par rapport au bruit de fond des souches induites par du CSP après 0 et 20 min. Le code couleur commun pour les différentes souches consiste en : sombre pour t=0 min et clair pour t=20 min. La boîte à moustache représente de bas en haut le premier quartile et le troisième quartile, avec au milieu la médiane. Le point dans la boîte correspond à la moyenne. Les traits de part et d'autre de la boîte à moustache déterminent le minimum en bas et le maximum en haut. C. Histogramme du pourcentage de cellules fluorescentes (compétentes) en fonction du temps.

rapport à une souche sauvage. Ce résultat suggère que, bien que toutes les cellules soient capables de devenir compétentes, l'activité d'hydrolyse de l'ATP d'UbK pourrait jouer un rôle dans le processus de transformation. Les mutants de phosphorylation d'UbK montrent des différences qui ne semblent pas significatives. Nous n'avons cependant pas observé de variations d'expression de  $P_{ssbB-gfp}$  dans ces mutants par rapport à la souche sauvage. Nous émettons l'hypothèse que l'activité d'hydrolyse de l'ATP d'UbK pourrait moduler l'efficacité de transformation, par exemple en intervenant au niveau du processus de recombinaison ou de la prise en charge de l'ADN, qui n'aurait pas été détecté avec le rapporteur  $P_{ssbB-gfp}$ .



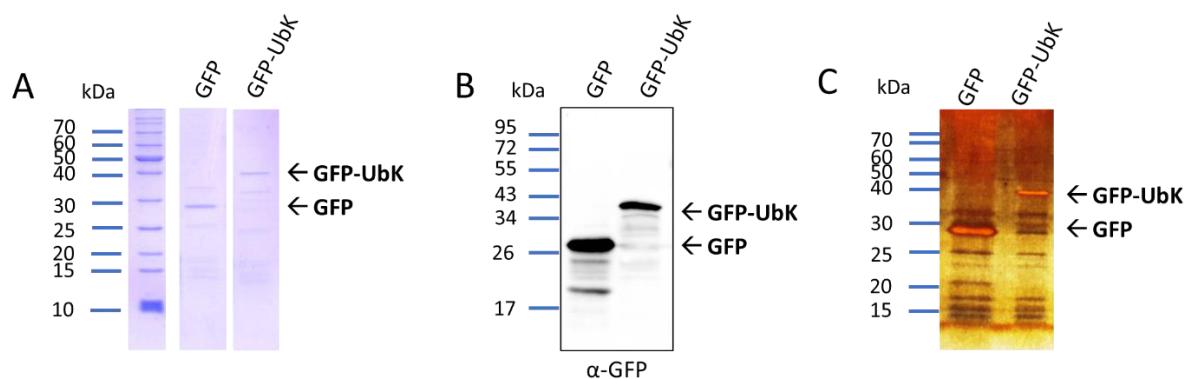
**Figure 66 : Efficacité de transformation des mutants *ubk* par rapport à la souche sauvage (WT).** Deux ADN donneurs (barres d'histogrammes gris clair et gris foncé) ont été utilisés pour évaluer les pourcentages de transformation par une souche complétée pour UbK (RB), un mutant  $\Delta ubk$ , un mutant catalytique *ubk* K36R et les mutants de phosphorylation phosphoablatif *ubk* Y58F et phosphomimétique *ubk* Y58E. Chaque valeur est une moyenne de trois expériences, et représentée sous forme du ratio de transformation par rapport à la souche sauvage (WT) avec les barres d'erreurs.

#### 1.2.5. Recherche de partenaires et/ou substrat de d'UbK en lien avec le développement de la compétence

L'implication d'UbK dans le contrôle de la compétence tardive et *in fine* dans la transformation, mais également dans la croissance/morphologie du pneumocoque, suggère son interaction avec d'autres acteurs, dont certains pourraient être des produits de gènes induits lors de la compétence. Nous avons donc réalisé une co-immunoprécipitation de GFP-UbK après 20 min d'induction par du CSP à 37°C (Figure 67). L'analyse par gel SDS-PAGE



montre des bandes additionnelles à GFP et GFP-UbK (Figure 67A). La révélation de ces échantillons avec un anticorps anti-GFP montre cependant que la plupart des bandes observées résulte probablement de la dégradation des protéines purifiées (Figure 67B). Nous avons également utilisé la coloration au nitrate d'argent, afin de révéler plus finement des bandes correspondant à d'éventuels partenaires (Figure 67C). Nous observons des profils de protéines assez similaires entre la révélation du signal avec l'anticorps et celle du gel au nitrate d'argent, pour les souches témoin et GFP-UbK, traduisant de la dégradation protéique et du « collage » à l'étiquette GFP plutôt que la présence d'un partenaire d'UbK. Nos conditions ne nous ont donc pas permis d'identifier de partenaire d'UbK en condition d'induction de la compétence.



**Figure 67 : Co-immunoprécipitation de GFP-UbK en condition d'induction de la compétence.** La souche *gfp-ubk* a été induite à  $DO_{550nm}=0.1$  par du CSP pendant 20 min à 37°C. A. SDS-PAGE de GFP-UbK purifiée *via* son étiquette GFP. B. Immunodétection de la co-immunoprécipitation de GFP-UbK avec un anticorps anti-GFP ( $\alpha$ -GFP). C. Révélation au nitrate d'argent de la co-immunoprécipitation de GFP-UbK.

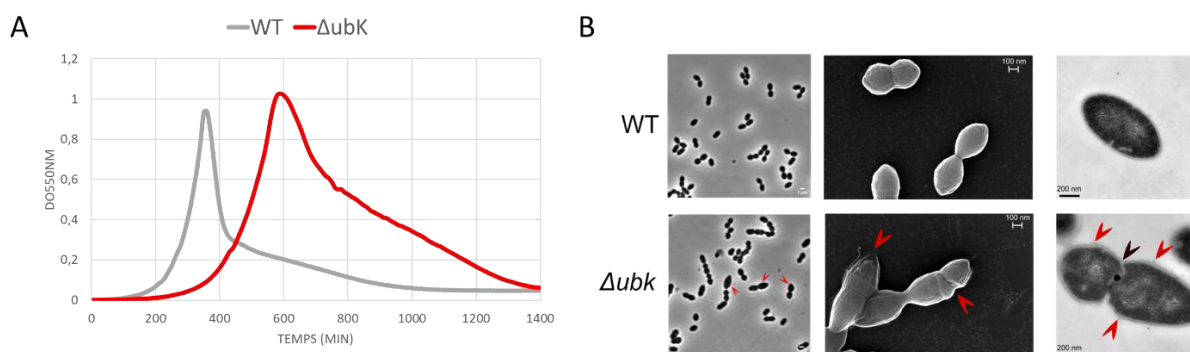
Pour conclure, nous avons analysé l'environnement génétique d'*ubk* à la recherche de partenaires ou de substrats de la kinase UbK. La protéine GNAT phosphorylée *in vitro* par UbK, n'a cependant pas été confirmée *in vivo* par purification de GNAT-GFP comme étant un substrat en utilisant la spectrométrie de masse.

Par ailleurs, nous avons étudié le rôle d'UbK en compétence puisque son gène est présent dans un opéron induit précocement lors de la compétence. L'expression de GFP-UbK, révélée par un anticorps anti-GFP, semble constante au cours du cycle cellulaire et lorsque la compétence est induite par du CSP. Nous avons analysé séparément les effets de l'absence d'*ubk* sur l'induction des phases précoce et tardive de la compétence. Nos résultats ont

démonstré que l'absence d'*ubk* n'influence pas l'induction précoce, mais que la compétence tardive est diminuée de 30-40%, et ce, indépendamment de la mutation suppressive dans *asnS*. De plus, les phénotypes de retard de croissance et de morphologie cellulaire anormale du  $\Delta ubk$  ne sont pas à l'origine de cet effet sur la compétence. L'altération de l'induction de la compétence tardive se traduit par un taux de transformation d'un ADN donneur qui est réduit du même ordre, soit de 30-40%.

Puisqu'UbK est une auto-Tyrosine protéine-kinase, nous nous sommes interrogés sur le lien entre son autophosphorylation et l'effet de son absence sur la compétence. Nos analyses ont révélé que l'activité d'hydrolyse de l'ATP semble contribuer à la transformation, puisque des souches produisant UbK ne pouvant hydrolyser l'ATP montre une efficacité de transformation diminuée. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle d'UbK dans le contrôle de la compétence, qui se répercute sur l'expression des gènes tardifs. L'activité d'hydrolyse de l'ATP d'UbK contribuerait au contrôle de facteurs permettant la transformation et intervenant en aval de l'étape d'import de l'ADN dans la cellule. Aucun partenaire d'UbK lors de la compétence n'a cependant pu être mis en évidence dans nos conditions.

## 2. Etude du lien entre UbK et le cycle cellulaire

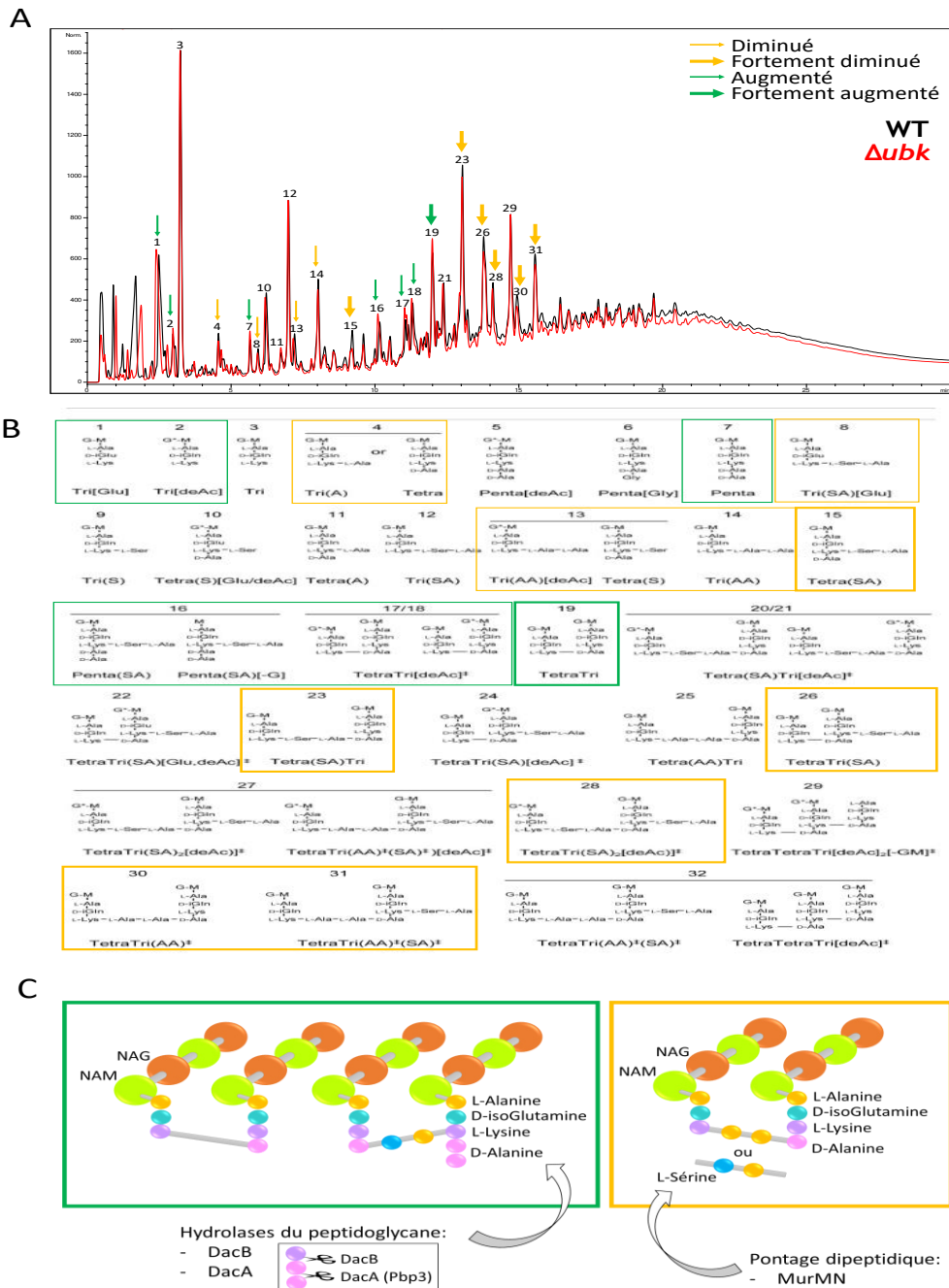


**Figure 68 : Croissance et morphologie cellulaire du mutant  $\Delta ubk$ .** A. Courbe de croissance à  $DO_{550nm}$  des souches sauvage WT (en gris) et  $\Delta ubk$  (en rouge) en fonction du temps. B. Morphologie cellulaire des WT et  $\Delta ubk$  en microscopie à contraste de phase (fond gris), électronique à balayage (fond noir) et à transmission (fond clair). Les flèches rouges et noires pointent des défauts de la paroi (pôles non couverts, cassures et écaillages) et les septa mal positionnés respectivement.

Dans l'article présenté dans la partie I des résultats, nous avons montré que l'absence d'*ubk* conduit à une croissance altérée, ainsi qu'à des défauts de morphologie majeurs résultant en des cellules difformes, possédant notamment une paroi mal structurée, ainsi que de multiples septa de division mal positionnés (Figure 68). L'ensemble de ces données suggère une altération du cycle cellulaire.

## 2.1. Intégrité de la paroi en absence d'*ubk*

La paroi, constituée majoritairement de peptidoglycane, confère la forme cellulaire ovoïde caractéristique du pneumocoque, et lui permet de résister à la pression osmotique de son environnement. Nous avons observé par microscopie électronique que l'intégrité de la paroi du pneumocoque est compromise en absence d'*ubk*, avec des pôles non couverts, des cassures et de l'écaillage (Figure 6 de l'article partie I des résultats et Figure 68). Afin de comprendre en quoi l'absence d'UbK modifie l'ultrastructure de la paroi, nous avons préparé le peptidoglycane de la souche  $\Delta ubk$  afin de l'analyser par spectrométrie de masse après séparation par HPLC sur un gradient de méthanol. Cette analyse a été réalisée en collaboration avec M-P. Chapot-Chartier de l'institut INRAE-Micalis. Nous observons des pics sur le chromatogramme, qui correspondent à des structures composant la paroi (voir introduction chapitre II.2.1.1). Sur cette analyse, nous pouvons distinguer la composition des pentapeptides liés au NAM, digérés en tetrapeptides et en tripeptides, respectivement par les carboxypeptidases DacA et DacB (Figure 69). De plus, nous pouvons discriminer si ces peptides sont liés entre eux directement, ou indirectement avec un pont L-Ala-L-Ala ou L-Ser-L-Ala entre la L-Lysine en position 3 du peptide et la D-Alanine en position 4, ajouté par les enzymes MurMN (Figure 69C). Par ailleurs, cette analyse nous permet également d'évaluer l'état de la N-acétylation de NAG, dont la déacétylation est réalisée par PgdA. Les spectres superposés de l'analyse de la paroi entre une souche sauvage et un mutant  $\Delta ubk$  montrent des différences d'intensité des pics, et donc une composition différente entre ces deux souches (Figure 69A). Nous observons pour le mutant une diminution des tripeptides branchés, et une diminution plus forte des tetrapeptides branchés liés ou non à un tripeptide. Globalement, nous observons une diminution des muuropeptides branchés pour les tripeptides et les tetrapeptides. A l'inverse, nous pouvons noter une augmentation des tripeptides, et des tripeptides liés directement au tetrapeptides indépendamment de l'acétylation. De plus, nous



**Figure 69 : Composition du peptidoglycane de souches WT et  $\Delta ubk$ .** A. Spectre HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) dont les fractions ont été analysées par LC-MS<sup>2</sup> et identifiées en utilisant une base de données. Les spectres des souches WT (en noir) et  $\Delta ubk$  (en rouge) sont superposés, ce qui permet de comparer quantitativement les variations des composés du peptidoglycane pour chaque pic. Les flèches en jaune représentent les pics d'intensité diminuée pour le mutant par rapport au WT et en vert les pics d'intensité augmentée. La largeur de la flèche traduit une augmentation ou une diminution plus importante. L'attribution des pics a été réalisée à l'aide de la publication de Bui et al., 2012 (Hsu et al., 2017; Kuru et al., 2012). Les pics au-dessus desquels ne se trouvent pas de numéro d'attribution n'ont pas pu être corrélés à une sous-structure du peptidoglycane. B. Correspondance entre la numérotation des pics du spectre et les structures composant le peptidoglycane. Le code couleur est le même que celui utilisé en A. C. Représentation schématique du peptidoglycane et des structures plus (en vert) ou moins (en jaune) représentées chez le mutant  $\Delta ubk$  par rapport à la souche sauvage, avec les protéines éventuellement impliquées dans la synthèse de la paroi.

observons une augmentation des pentapeptides, cohérent avec la diminution des tripeptides et des tetrapeptides. De la même manière, les pentapeptides branchés sont favorisés au profit des tetrapeptides liés aux tripeptides par un pont indirect (Figure 69A et B). Dans sa globalité, le peptidoglycane d'un mutant  $\Delta ubk$  montre plus de pentapeptides branchés. Ces résultats préliminaires suggèrent qu'UbK pourrait influencer la fonction d'enzymes impliquées dans la biosynthèse ou le remodelage de la paroi.

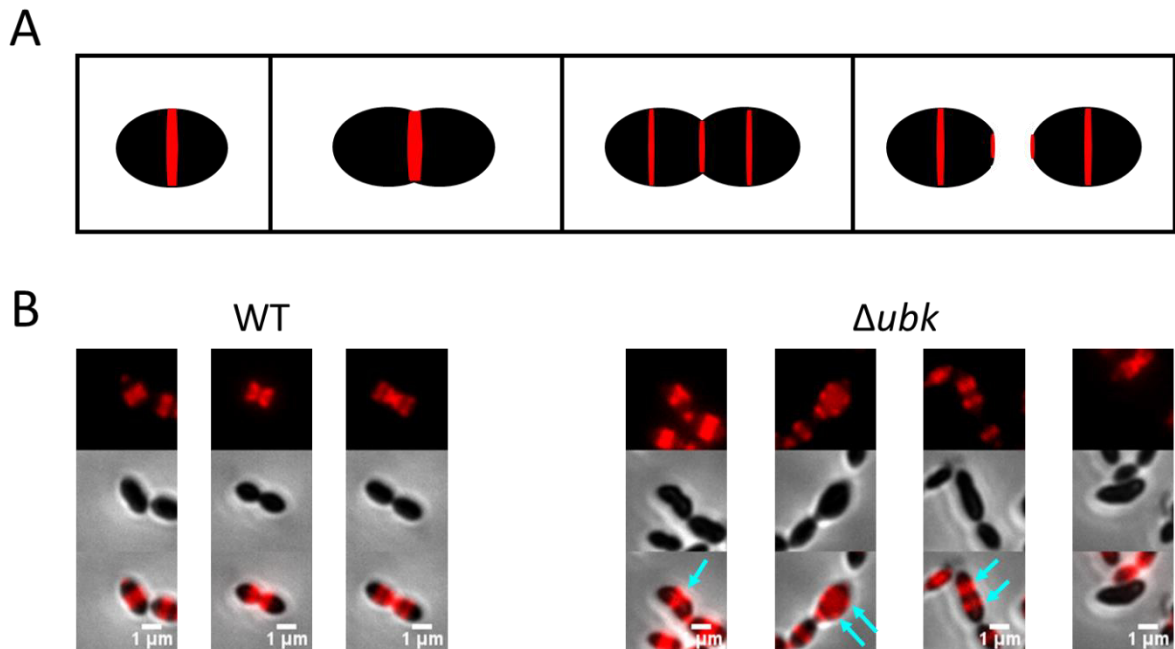
## 2.2. UbK et la machinerie de division

La synthèse de la paroi est réalisée au milieu de la cellule par le divisome, qui est responsable à la fois de l'élongation et de la constriction cellulaire. Afin d'expliquer les défauts de paroi du mutant  $\Delta ubk$  observés en microscopie électronique, nous avons localisé la synthèse du peptidoglycane par microscopie. Pour cela, nous avons utilisé des acides-aminés de type D fluorescents FDAAs (*Fluorescent D-Amino-Acids*) et plus précisément le TDL (TAMRA-D-lysine) qui émet dans le rouge (Hsu et al., 2017; Kuru et al., 2012). Les FDAAs sont incorporés à la place des D-Ala des peptides composant le peptidoglycane par l'activité futile des PBPs. Le TDL a été incubé avec nos cellules afin que la fluorescence détectée reflète les sites de synthèse du peptidoglycane.

Chez le pneumocoque, la synthèse de la paroi est réalisée au centre de la cellule, et est nécessaire à l'élongation et à la constriction cellulaire. Ainsi, sur nos images, nous observons bien une bande au milieu de la cellule au début du cycle cellulaire. A des stades plus avancés de la division cellulaire, la synthèse de peptidoglycane est localisée aux futurs sites de division à l'équateur, qui constitueront ensuite les nouveaux sites de division (Figure 70A). Certaines cellules présentent un marquage à un pôle de la cellule, qui correspond à l'ancien site de synthèse de la paroi. En effet, la division cellulaire du pneumocoque est semi-conservative, donc seule la moitié de la cellule possède du peptidoglycane nouvellement synthétisé. Il est important que noter que puisque les cellules sont asynchrones, différents profils de fluorescence sont obtenus en fonction du stade de division dans laquelle était la cellule au début du marquage.

De manière intéressante, les cellules  $\Delta ubk$  montrent des profils différents de ce qui est observé chez une souche sauvage. Notamment, nous observons des marquages irrégulier (panel 1 Figure 70B) et de multiples bandes (panels 2 et 3 Figure 70B). Certaines cellules sont

incapables d'intégrer le marquage, probablement du fait de l'arrêt de leur cycle cellulaire (panel 4 Figure 70B). L'absence d'UbK conduit donc à des défauts des sites d'insertion du peptidoglycane.



**Figure 70 : Localisation de la machinerie de synthèse du peptidoglycane en absence d'*ubk*.** A. Schéma de l'incorporation du TDL au fur et à mesure de la division cellulaire pour la souche sauvage. Le TDL est représenté en rouge et la bactérie en noir. B. Visualisation en microscopie optique à contraste de phase et à fluorescence de l'incorporation de TDL pendant 25 min à 37°C. Différents clichés présentent les différents profils obtenus en fonction de l'état d'avancement de la cellule dans le cycle cellulaire. Les flèches en bleu montrent les sites d'insertion de la paroi dans le mutant  $\Delta ubk$  qui présente des cellules malformées.

Ces résultats sont cohérents avec l'observation en microscopie électronique de septa mal positionnés (Figure 68), qui induisent probablement un placement du divisome ailleurs qu'au centre de la cellule. Ainsi, la paroi serait synthétisée au niveau de ces septa surnuméraires, qui serait inactifs puisqu'ils ne sont pas capables d'induire la constriction cellulaire. Cette synthèse anormale pourrait conduire à une paroi défectueuse, comme en témoigne l'écaillage observé Figure 68. L'accumulation de défauts pourrait ainsi arrêter la division cellulaire et conduire à la lyse. Cette observation nous conduit donc à nous questionner sur la localisation du divisome dans ces cellules.

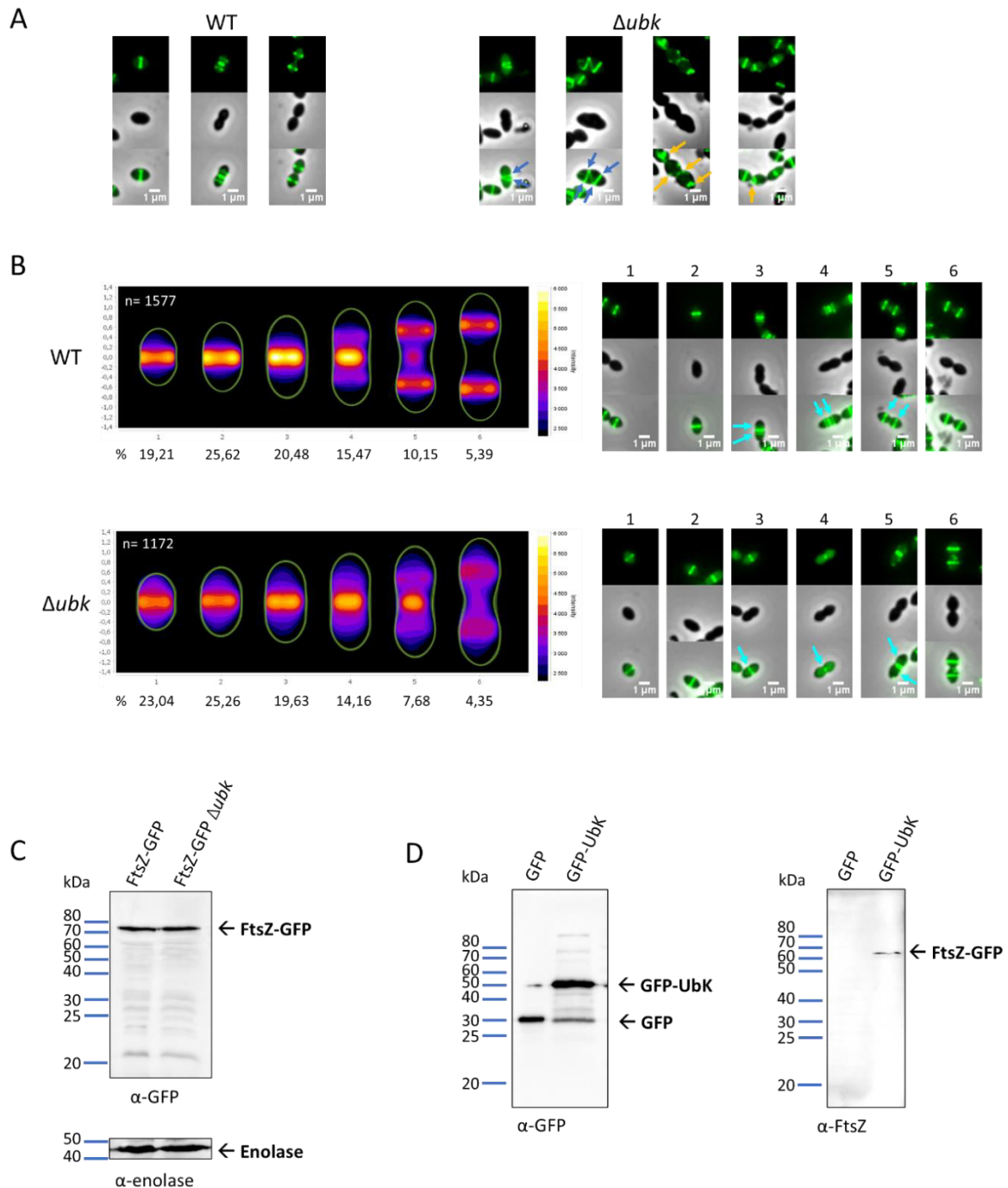
La protéine majeure responsable de la mise en place du divisome et qui coordonne la synthèse de la paroi avec la constriction de la cellule est la protéine FtsZ. Nous nous sommes donc intéressés à la localisation de FtsZ en absence d'*ubk*. Pour cela, nous avons utilisé une souche pour laquelle la GFP est fusionnée du côté C-terminal de FtsZ, et dont la fonctionnalité

a déjà été démontrée dans d'autres études (Fleurie et al., 2014a). De la même manière à ce qui a été décrit dans la littérature, FtsZ est présente au site de division et migre progressivement aux futurs sites de division au fur et à mesure de la division cellulaire (Figure 71A et B). FtsZ est une protéine qui migre précocement aux futurs sites de division. Pour étudier sa dynamique, nous avons séparé morphologiquement nos cellules en fonction de l'état d'avancement du cycle cellulaire, et généré six stades cellulaires. Ainsi, la migration de FtsZ aux futurs sites de division démarre dès le stade 3 (Figure 71B).

En absence d'*ubk*, les profils de localisation de FtsZ s'avèrent aberrants (Figure 71A et B). Ainsi, nous observons la présence de plusieurs anneaux, qui peuvent être dédoublés ou hélicoïdaux (panels 1 et 2 Figure 71A). Par ailleurs, nous observons des sortes de foci de fluorescence, dispersés dans la cellule, qui pourraient correspondre à la protéine FtsZ incapable de former un anneau, tant dans des cellules morphologiquement anormales que « normales » (panel 3 et 4 Figure 71A). En plus de défauts cités précédemment, nous observons une localisation plus diffuse de FtsZ tout au long du cycle cellulaire en absence d'*ubk* (Figure 71B). Lorsque nous observons les cellules au microscope, nous n'observons la présence de FtsZ aux futurs de division qu'à partir du stade 5, contrairement au WT qui commençait à relocaliser dès le stade 3 (Figure 71B). Cependant, nous pouvons attribuer ce résultat à une localisation plus diffuse de FtsZ dans les cellules  $\Delta ubk$ , plutôt qu'à une délocalisation comme cela est illustré par la carte de chaleur. Ces résultats suggèrent donc un retard et/ou une instabilité de la localisation de FtsZ aux sites de division en absence d'*ubk*. Nous avons vérifié que l'expression de *ftsZ-gfp* reste en revanche similaire en présence ou en absence d'UbK (Figure 71C). Une interaction *in vivo* est de plus détectée entre UbK et FtsZ après co-immunoprécipitation de GFP-UbK. Ceci suggère que la modulation de l'interaction de ces deux protéines pourrait affecter, au moins partiellement, la localisation de FtsZ aux futurs sites de division.

FtsZ recrute de nombreuses protéines du divisome afin d'assurer la division cellulaire. L'interaction entre FtsZ et UbK suggère l'interaction d'UbK avec d'autres protéines de la division.

Afin d'identifier d'autres partenaires potentiels d'UbK impliqués dans la division cellulaire, nous avons réalisé une co-immunoprécipitation de GFP-UbK. Après coloration au

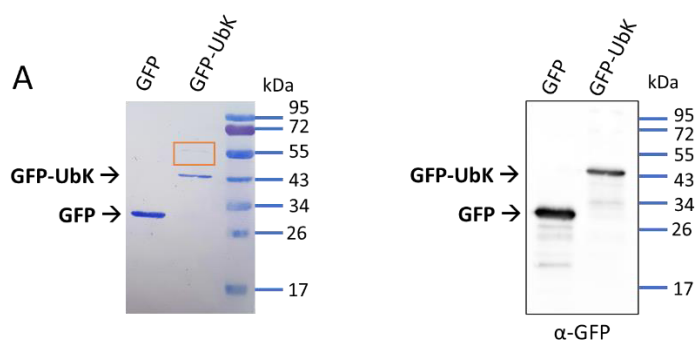


**Figure 71 : Localisation de FtsZ en absence d'*ubk*.** A. Localisation aberrante de FtsZ-GFP dans les cellules  $\Delta ubk$ . Les flèches bleues montrent des anneaux multiples dans les cellules. Les flèches jaunes indiquent les « foci » de fluorescence de FtsZ. B. Dynamique de la localisation de FtsZ en absence d'*ubk*. Carte de chaleur de FtsZ-GFP réalisée avec l'outil bio-informatique Microbe J. Les différents stades du cycle cellulaire sont catégorisés par des numéros allant de 1 à 6, avec les pourcentages de cellules appartenant à chaque type respectif. Les images de microscopie en dessous de chaque numéro montrent des cellules à chacun de ces stades. Les flèches bleu clair montrent la localisation de FtsZ au centre de la cellule pour les stades 3 et 4, et aux futurs sites de division stade 5. C. Expression de FtsZ-GFP en présence et en absence d'UbK. Immunodétection de FtsZ-GFP avec un anticorps anti-GFP ( $\alpha$ -GFP) et de l'énolase avec un anticorps anti-énolase ( $\alpha$ -énolase) à partir d'extraits totaux de *ftsZ-gfp* en présence ou en absence d'*ubk*. D. Interaction *in vivo* de FtsZ et UbK. Immunodétection de la co-immunoprécipitation de GFP-UbK avec un anticorps anti-GFP ( $\alpha$ -GFP) et anti-FtsZ ( $\alpha$ -FtsZ).



bleu de Coomassie, nous avons détecté une bande co-purifiée avec UbK, aux alentours de 55 kDa (Figure 72A). Cette bande a été analysée par spectrométrie de masse, et plusieurs protéines ont été mis identifiées (Figure 72B). Dans cette liste, nous avons classé ces protéines en fonction : du pourcentage de couverture de la protéine identifiée, du nombre de peptides identifiés, du nombre de spectres obtenus pour identifier l'ensemble des peptides PSM (*Peptide Spectra Matches*), et du score de probabilité qu'une PSM soit correcte (inverse de PEP : *Posterior Error Probability*). L'ensemble de ces paramètres définissent une abondance relative de chaque protéine retrouvée dans l'échantillon. Ainsi, les protéines avec un PEP score élevé sont potentiellement plus abondantes dans la co-immunoprécipitation de GFP-UbK, et pourraient constituer des partenaires prometteurs.

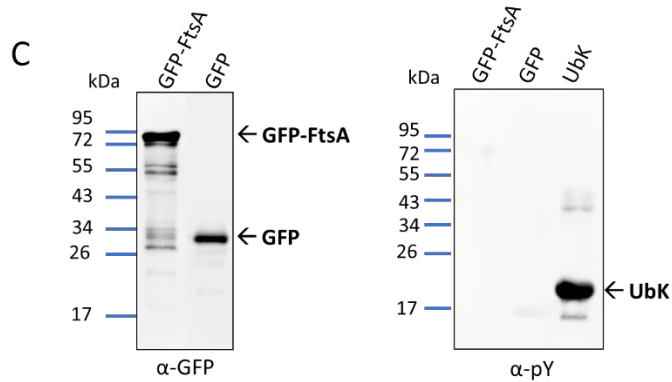
Une piste qui nous a paru intéressante au vu des défauts de division d'un mutant  $\Delta ubk$ , est la protéine de division FtsA. FtsA est une protéine essentielle connue pour « amarrer » l'anneau Z à la membrane, et proposée pour être impliquée dans la coordination de la synthèse périphérique et septale (Mura et al., 2017). Etant donné le profil de localisation aberrant de FtsZ dans un mutant  $\Delta ubk$ , il pourrait donc exister un lien fonctionnel entre UbK et FtsA. FtsA a été identifiée comme phosphorylée dans le phosphoprotéome de Sun et al. (Sun et al., 2010). L'hypothèse la plus évidente est donc que FtsA soit un substrat d'UbK. Nous avons donc évalué la phosphorylation de FtsA *in vivo* en réalisant une immunoprécipitation de GFP-FtsA. Nous n'avons pas mis en évidence de phosphorylation de FtsA sur la Tyrosine dans nos conditions. Cependant cela n'exclut pas que FtsA puisse être un partenaire d'UbK (Figure 72C). Nous avons donc analysé la localisation de FtsA dans le mutant  $\Delta ubk$  par rapport à celle dans des cellules WT.



**B**

Protéine	Masse moléculaire (kDa)	Pourcentage de couverture (%)	Nombre de peptides	PSM	Peptides uniques	PEP Score
Pyruvate kinase (spr0797)	54,7	80	37	107	37	271,296
Facteur d'élongation Tus (spr1343)	43,9	75	26	151	26	203,72
Arginine-ARNt ligase (spr1890)	63,4	74	38	45	38	145,929
<b>FtsZ (spr1510)</b>	<b>44,4</b>	<b>73</b>	<b>24</b>	<b>43</b>	<b>24</b>	<b>143,573</b>
<b>FtsA (spr1511)</b>	<b>49,4</b>	<b>80</b>	<b>26</b>	<b>47</b>	<b>26</b>	<b>135,102</b>
Inosine-5'-monophosphate déshydrogénase (spr2033)	52,4	71	22	31	22	109,43
Sérine-ARNt ligase (spr0372)	47,7	63	21	27	21	84,445
Chaperonine 60 kDa GroL (spr1722)	57,1	48	19	23	19	75,508
Asparagine-ARNt ligase AsnS (spr1397)	51,1	45	22	34	22	70,74
GTPase Der (spr1553)	49,1	46	16	22	16	69,215
Protéine de liaison à l'ATP, transporteur ABC (spr0678)	58,4	38	14	19	14	66,639
Protéine non caractérisée (spr1407)	59,4	38	15	18	15	64,845

Glutamine synthétase de type I (spr0444)	50,3	45	16	20	16	64,845
Glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase, dépendante du NADP (spr1028)	51	53	19	23	19	62,497
PTS spécifique du fructose IIABC (spr0780)	66,8	33	14	17	14	56,382
Glutamate-ARNt ligase (spr1881)	55,9	33	14	17	14	54,957
Pneumolysine (spr1739)	52,9	46	16	17	16	53,3
Protéase (spr1284)	48,6	43	13	16	13	52,466
Protéine de terminaison/antiterminaison de la transcription NusA (spr0478)	42,8	42	15	18	15	48,105
Système de restriction-modification de type I, sous-unité M (spr0449)	56,4	45	15	16	15	45,684
GTPase Obg (spr0984)	48,4	39	11	15	11	44,732
Protéine d'assemblage Fer-Souffre SufB (spr0775)	52,6	46	16	19	16	43,839
ATP synthase sous-unité alpha (spr1362)	54,6	32	14	19	14	43,481
Protéine de particule de reconnaissance du signal (spr1166)	57,7	30	9	10	9	42,833
D-alanine-D-alanyl transporteur protéine ligase (spr1982)	57,4	36	11	12	11	41,649



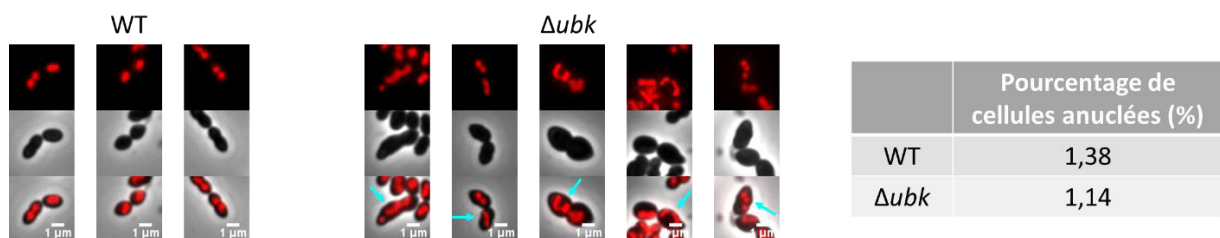
**Figure 72 : FtsA est un partenaire d'UbK.** A. Co-immunoprécipitation de GFP-UbK en présence de détergent. La membrane colorée au bleu de Coomassie après immunodétection avec un anticorps anti-GFP ( $\alpha$ -GFP) montre une bande co-purifiée avec UbK (rectangle orange). B. Liste des partenaires d'UbK identifiés par spectrométrie de masse. Les différentes protéines sont listées avec leur masse moléculaire en kilodalton (kDa), le pourcentage de couverture de la protéine par l'analyse (%), le nombre de peptides de la protéine obtenus, le nombre total de spectres obtenus pour identifier l'ensemble des peptides PSM, le nombre de peptides uniques et le PEP score qui correspond à la probabilité qu'une PSM soit correcte. C. Immunoprécipitation de GFP-FtsA, révélée avec des anticorps anti-GFP ( $\alpha$ -GFP) et anti-phosphotyrosine ( $\alpha$ -pY). Le témoin montre la phosphorylation sur la Tyrosine d'UbK purifiée.

Pour étudier sa dynamique, et de la même manière que pour FtsZ, nous avons séparé morphologiquement nos cellules en fonction de l'état d'avancement du cycle cellulaire, et généré six stades cellulaires. Dans les cellules WT, FtsA est présente au site de division tout au long du cycle cellulaire. A partir du stade 4, deux nouveaux anneaux de FtsZ relocalisent aux futurs sites de division (équateur cellulaire). A l'inverse, FtsA commence à migrer aux futurs sites de division de manière plus précoce dès le stade 3 (Figure 73A et B). De plus, et de manière très intéressante, le signal de FtsA au site de division disparaît à partir du stade 3. Ses observations montrent que la protéine FtsA n'est pas capable de se maintenir au site de division tout au long du cycle cellulaire et que sa relocalisation aux futurs sites de division est plus précoce (Figure 73A et 71A). Ce résultat suggère que l'interaction entre UbK et FtsA est nécessaire pour la localisation et la dynamique de FtsA tout au long du cycle cellulaire. Nous avons vérifié que cette localisation diffuse de FtsA n'était pas due à une modification de son expression en contexte  $\Delta ubk$ . FtsA est exprimée au même niveau en conditions WT et  $\Delta ubk$  (Figure 73D).

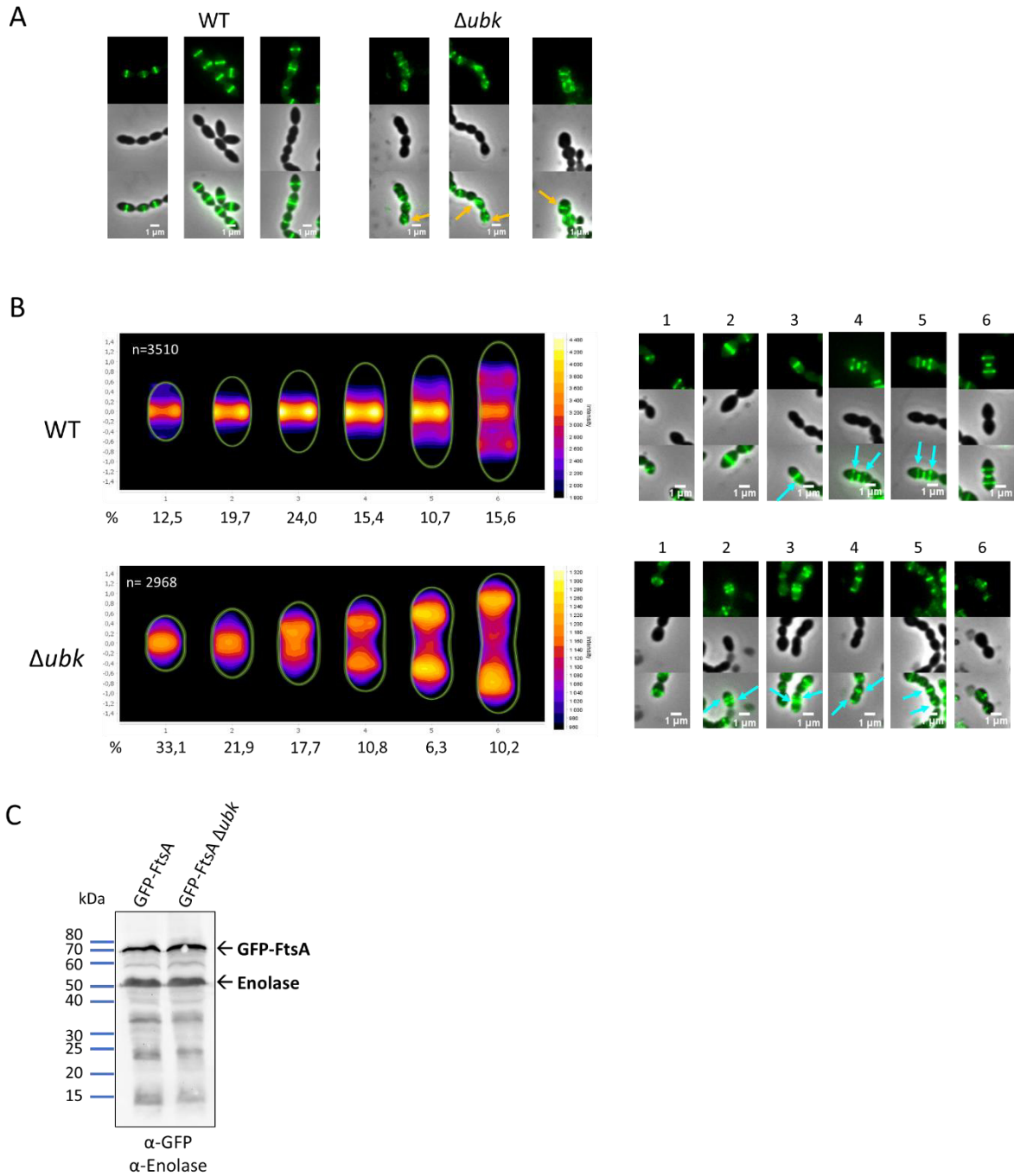
L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'UbK est essentielle à la localisation correcte de FtsA et, par conséquent, de FtsZ. En absence d'*ubk*, la stabilité du divisome en cours de constriction serait altéré, induisant un départ plus précoce de FtsA aux futurs sites de division. Ces défauts de constriction pourraient être à l'origine de cellules morphologiquement anormales.

### 2.3. Rôle d'UbK dans la réplication/ségrégation des chromosomes

Il est décrit dans la littérature que la division cellulaire est coordonnée avec la réplication et la ségrégation des chromosomes. Nous avons suivi la localisation de l'ADN dans les cellules dépourvues d'*ubk* grâce à la protéine HlpA, qui est homologue avec les histones eucaryotes (Kjos & Veening, 2014). *hlpA* est pour cela fusionnée à un marqueur fluorescent *mkate2* à son locus chromosomique chez *S. pneumoniae*. Le signal de fluorescence montre donc la localisation du nucléoïde dans les cellules. Nous observons qu'à des étapes précoces de la division, le chromosome est dupliqué et réparti progressivement dans les cellules filles au fur et à mesure de la division dans une souche sauvage (Figure 74). En absence d'*ubk*, le nucléoïde ne semble pas réparti de manière homogène dans la cellule ; il est plus diffus et partiellement fragmenté (Figure 74). Toutefois le pourcentage de cellules anuclées est similaire dans les souches  $\Delta ubk$  et sauvage (tableau Figure 74). Ce résultat suggère, qu'outre l'impact de Ubk sur la dynamique de localisation de FtsA et de FtsZ au cours du cycle cellulaire, Ubk impacterait directement ou indirectement la biologie du chromosome.



**Figure 74 : Répartition de l'ADN dans les cellules filles d'un mutant  $\Delta ubk$ .** Visualisation en microscopie à contraste de phase et à fluorescence de HlpA-*mkate2*. Les défauts du nucléoïde sont mis en évidence par des flèches bleues. Le pourcentage de cellules anuclées est présenté dans le tableau.



**Figure 73 : Localisation de FtsA en absence d'*ubk*.** A. Localisation aberrante de GFP-FtsA dans les cellules  $\Delta ubk$ . Les flèches jaunes montrent des défauts de localisation de FtsA. B. Dynamique de la localisation de FtsA en absence d'*ubk*. Carte de chaleur de FtsA-GFP réalisée avec l'outil bio-informatique Microbe J. Les différents stades du cycle cellulaire sont catégorisés par des numéros allant de 1 à 6, avec les pourcentages de cellules appartenant à chaque type respectif. Les images de microscopie en dessous de chaque numéro montrent des cellules à chacun de ces stades. Les flèches bleu clair indiquent la relocalisation de FtsA aux futurs sites de division. C. Expression de FtsA-GFP en présence et en absence d'UbK. Immunodétection de FtsA-GFP avec un anticorps anti-GFP ( $\alpha$ -GFP) et de l'énolase avec un anticorps anti-énolase ( $\alpha$ -énolase) à partir d'extraits totaux de *ftsA-gfp* en présence ou en absence d'*ubk*.



# Discussion





J'ai démontré qu'UbK est une protéine-kinase capable de s'autophosphoryler sur une unique Tyrosine. Elle est impliquée dans la croissance et la morphogénèse bactérienne. Cependant, il est important de noter que la délétion du gène *ubk* n'est possible qu'en présence d'une mutation suppressive localisée dans le gène *asnS*. Nous avons montré que l'activité d'hydrolyse de l'ATP d'UbK, contrôlée par son autophosphorylation, et le niveau de cette autophosphorylation, régulent la croissance et la morphologie du pneumocoque. Les mutants d'*ubk* présentent une morphologie anormale avec des défauts de paroi et des septa mal positionnés. Nous avons aussi mis en évidence qu'UbK est un acteur clé du développement de la compétence tardive, et plus particulièrement de la transformation bactérienne. De plus, nous avons observé que la délétion d'*ubk* influence la dynamique de localisation de deux protéines, FtsZ et FtsA, importantes de la division cellulaire. Ces résultats laissent à penser que la localisation et/ou le fonctionnement de machinerie de synthèse de la paroi sont dépendants de l'activité d'UbK. UbK agirait donc comme un régulateur de la division cellulaire dont la fonction serait médiée par son activité d'hydrolyse de l'ATP, contrôlée elle-même par son niveau d'autophosphorylation. Dans cette discussion je présenterai différents éléments de réflexion liés à ces observations.

### **AsnS et UbK sont liées fonctionnellement.**

La délétion d'*ubk* conduit à la co-apparition d'une mutation suppressive dans le gène *asnS*. Cette mutation change l'Aspartate 121 d'AsnS en Alanine. L'introduction de la mutation suppressive seule dans le génome du pneumocoque montre que les phénotypes sont liés à la délétion d'*ubk* uniquement. Il n'existe pas d'études sur le rôle d'AsnS chez le pneumocoque à ce jour mais *asnS* coderait pour une Asparaginyl-ARNt synthétase dont nous avons confirmé l'essentialité chez le pneumocoque.

Les protéines de la famille AsnS permettent le chargement de l'Asparagine sur l'ARNt correspondant, afin d'incorporer cet acide-aminé dans les protéines au cours de la traduction. La plupart des bactéries possèdent une amino-acyl-ARNt synthétase par acide-aminé. Cependant, certaines bactéries, comme *Helicobacter pylori*, sont dépourvues d'Asparaginyl-ARNt synthétase ou de Glutaminyl-ARNt synthétase (Becker & Kern, 1998). Afin d'assurer la traduction de leurs protéines, ces bactéries possèdent une voie indirecte permettant la

formation d'intermédiaires Asp-ARNt<sup>Asn</sup> ou de Glu-ARNt<sup>Gln</sup>, qui sont convertis en Asn-ARNt<sup>Asn</sup> ou Gln-ARNt<sup>Gln</sup> par les amidotransférases GatCAB (Hausmann & Ibba, 2008). Ces deux voies de synthèse, impliquant GatCAB ou AsnS, sont généralement exclusives, puisqu'elles dépendent de la présence ou de l'absence d'amino-acyl-ARNt synthétase spécifiques. Cependant, chez le pneumocoque, nous identifions les gènes des ARNt synthétases dédiées à l'Aspartate (AspS) et à l'Asparagine (AsnS), mais également les enzymes GatCAB, suggérant la co-existence des deux voies de synthèse d'Asn-ARNt. Le caractère essentiel d'*asnS* tend à démontrer que la bactérie ferait usage d'AsnS dans nos conditions d'expérimentation. Nous envisageons par la suite d'étudier l'effet de la mutation D121A dans AsnS sur son activité et/ou sa localisation, mais également sur les substrats/partenaires d'UbK, afin de comprendre comment elle permet la délétion d'*ubk*. Il serait intéressant de déterminer les conditions pour lesquelles AsnS n'est pas indispensable, et donc substituable par GatCAB, et d'observer si les phénotypes associés à l'absence d'*ubk* sont toujours présents. Ainsi, le rôle régulateur d'UbK sur la croissance et la morphogénèse du pneumocoque pourrait dépendre d'une condition particulière.

Une étude bio-informatique propose que certains sites de phosphorylation aient évolué au cours du temps pour devenir des résidus phosphomimétiques, affranchis de tout contrôle par une protéine-kinase (Pearlman et al., 2011). L'Aspartate, tout comme le Glutamate, est connu pour sa capacité à mimer une phosphorylation, de par son encombrement stérique et sa charge négative. Ces résidus sont d'ailleurs utilisés pour générer des mutants phosphomimétiques dégagés du caractère transitoire et réversible de la phosphorylation (Getz et al., 2019).

De manière surprenante, la mutation D121A dans AsnS correspond au type de mutation réalisé pour transformer un site de phosphorylation potentiel (Sérine, Thréonine ou Tyrosine) dans un état de phosphorylation permanente (Asp) ou de déphosphorylation permanente (Ala). Nous avons donc émis l'hypothèse que la mutation dans *asnS* pourrait s'inscrire dans cette configuration et qu'AsnS pourrait avoir été un substrat d'UbK, qui au cours de l'évolution, aurait évolué vers une forme mimant un état de phosphorylation permanente. Ce scénario serait cohérent avec l'apparition d'une mutation mimant un état de déphosphorylation permanent lorsqu'UbK est inactivée. De plus, l'élaboration d'un modèle d'AsnS à partir de la structure existante de *P. horikoshii* nous indique que le résidu 121 est

exposé, et donc éventuellement accessible pour une phosphorylation. Nous avons donc construit un mutant dans lequel l'Aspartate 121 d'AsnS est muté en Tyrosine. Nous n'avons cependant pas mis en évidence de phosphorylation d'AsnS D121Y par UbK. L'analyse de la phosphorylation d'AsnS D121Y, directement purifiée chez le pneumocoque, par spectrométrie de masse, n'a pas permis de couvrir le peptide contenant la Tyrosine 121. Nous ne pouvons toutefois pas écarter le fait qu'UbK puisse éventuellement phosphoryler des protéine-substrats sur les Sérines et les Thréonines. En effet, UbK de *B. subtilis* (YdiB) s'autophosphoryle sur la Sérine, la Thréonine et la Tyrosine, bien que majoritairement sur la Sérine et la Thréonine, et phosphoryle son substrat YdiE sur les mêmes résidus *in vitro* (Nguyen et al., 2017).

L'identification par spectrométrie de masse des protéines co-immunoprécipitées avec UbK en présence de détergent, montre qu'AsnS fait partie de ces protéines. Ceci suggère qu'une protéine, qui reste à identifier, pourrait assurer le lien entre UbK et AsnS, toutes deux cytoplasmiques. Cette observation nous encourage à tester la phosphorylation d'AsnS D121S/T par UbK.

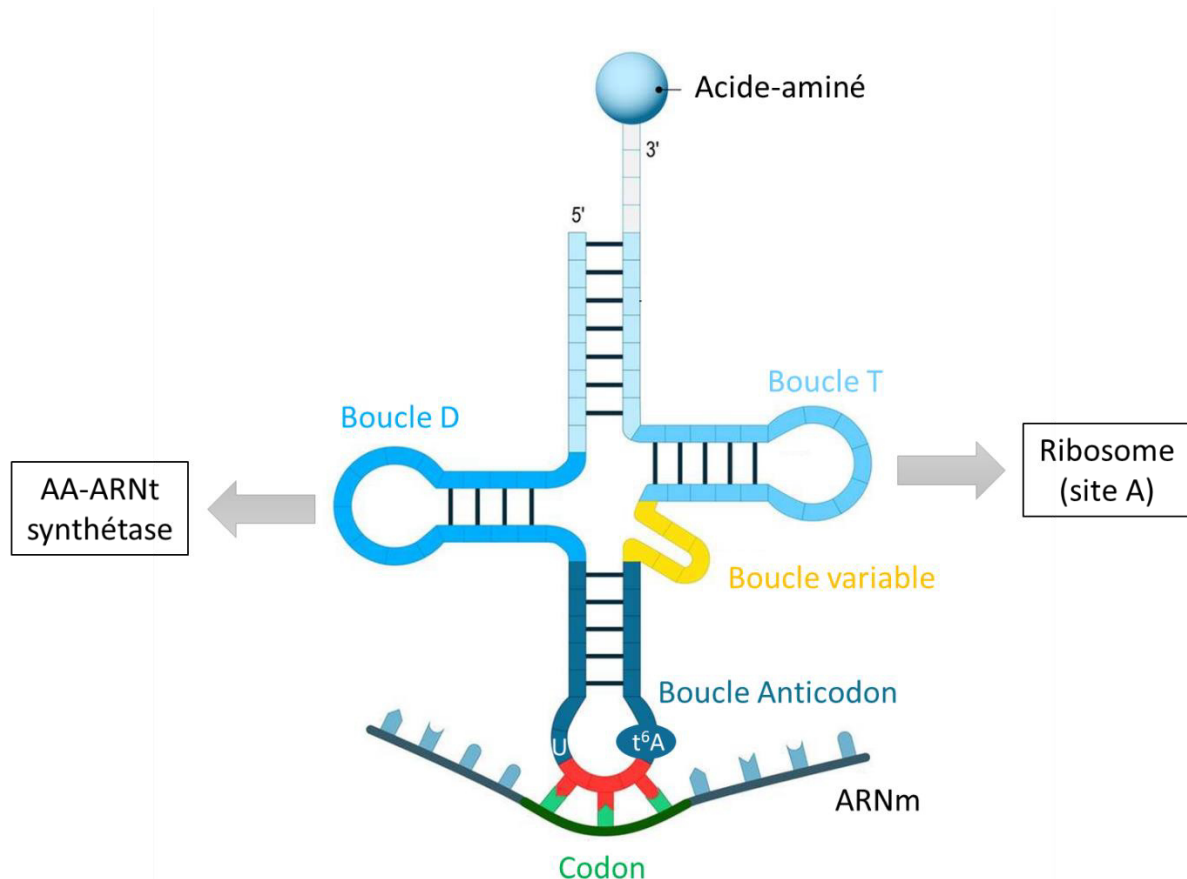
### **Des substrats et partenaires issus de l'environnement génétique d'*ubk* ?**

L'environnement génétique des gènes des protéines-kinases de la famille UbK varie remarquablement d'un micro-organisme à l'autre (Figure 54). Chez le pneumocoque, *ubk* se trouve dans un opéron dont l'expression est décrite comme induite lors de la compétence (Figure 53).

Les protéines de la famille UbK chez *B. subtilis* et *E. coli* révèlent des fonctions communes. Les protéines YdiBCE chez *B. subtilis*, et YjeE-YgjD-YeaZ chez *E. coli* ont été décrites comme formant un complexe impliqué dans la biosynthèse de l'ARNt modifié qu'est le N6-thréonylcarbamoyl adénosine t<sup>6</sup>A *in vitro* (Deutsch et al., 2012; Lauhon, 2012; Zhang et al., 2015).

Cette voie universelle permet de modifier l'adénine proche de la boucle anticodon de l'ARNt en lui ajoutant un groupement thréonylcarbamoyl, résultant en un t<sup>6</sup>A. La structure volumineuse générée empêche ainsi l'appariement avec l'uracile à proximité. Ceci permet la

formation de la boucle anticodon, nécessaire pour l'ajout d'un acide-aminé spécifique chargé sur son ARNt, dans la protéine en cours de traduction (Figure 75). Des mutants de la synthèse du t<sup>6</sup>A montrent une augmentation des décalages des cadres de lecture, et des sélections incorrectes des codons de départ, ce qui impacte de nombreuses fonctions cellulaires (Thiaville et al., 2015).



**Figure 75 : Structure de l'ARNt et de la modification du t<sup>6</sup>A.** L'ARNt permet de charger l'acide-aminé correspondant au codon de l'ARNm (en vert). Il possède une structure similaire à un trèfle avec une boucle D (bleu foncé) qui interagit avec la protéine AA-ARNt synthétase associant le bon acide-aminé (AA) en 3' de l'ARNt, une boucle variable (en jaune) et une boucle T qui se positionne dans le site A du ribosome. C'est la boucle anticodon (bleu marine) qui lit par la séquence anticodon (en rouge) le codon correspondant à un acide-aminé spécifique. L'adénine modifiée t<sup>6</sup>A ne peut plus s'apparier avec l'uracile, ce qui forme la boucle anticodon. Adapté de (Deutsch et al., 2012).

La présence de l'ATP est nécessaire pour la formation du complexe tripartite YdiBCE chez *B. subtilis* et YjeE-YgjD-YeaZ chez *E. coli*. Cependant, la biosynthèse du t<sup>6</sup>A peut se faire sans ATP, une fois le complexe formé (Lauhon, 2012; Zhang et al., 2015). Les mécanismes par lesquels YdiBCE et YjeE-YgjD-YeaZ modulent la biosynthèse du t<sup>6</sup>A ne sont pas encore élucidés. Il a été proposé un modèle chez *Thermotoga maritima* selon lequel TsaBD (les homologues de

YdiCE et YgjD-YeaZ) participent à la biosynthèse du t<sup>6</sup>A. TsaC (l'homologue de YdiD et YrdC) réalise la synthèse du précurseur de cette voie qu'est le thréonylcarbamoyl adénylate TC-AMP. TsaE (l'homologue d'YdiB et YjeE) couplée à l'ATP servirait d'activateur de TsaBD, qui prend en charge le TC-AMP et le charge sur l'adénine de l'ARNt pour former le t<sup>6</sup>A. Une fois la réaction réalisée, TsaE hydrolyserait l'ATP, pour permettre à TsaBD de réaliser un autre cycle de synthèse du t<sup>6</sup>A (Luthra et al., 2018). Par ailleurs, YdiB de *B. subtilis* est capable de phosphoryler YdiE *in vitro* (Nguyen et al., 2017). Ainsi, la phosphorylation pourrait permettre d'activer YdiCE (les homologues de TsaBD) pour réaliser un nouveau cycle de synthèse du t<sup>6</sup>A.

De manière intéressante, l'analyse par spectrométrie de masse des protéines co-immunoprécipitées avec UbK chez *S. pneumoniae*, montre une forte probabilité d'interaction d'UbK avec la t<sup>6</sup>A transférase (Spr0131). Spr0131 est l'homologue de YdiE chez *B. subtilis*, dont le gène est en opéron avec *ydiB* et *ydiC*. Nous n'avons cependant pas observé de phosphorylation de Spr0131 ou de Spr0129 (homologue de YdiC) par UbK *in vitro*. Bien que les gènes *ubk*, *spr0129* et *spr0131* ne soient pas tous membres d'un même opéron chez *S. pneumoniae*, nous ne pouvons pas exclure la participation de leurs protéines à un complexe de synthèse du t<sup>6</sup>A. En effet, UbK pourrait réguler la biosynthèse du t<sup>6</sup>A en interagissant et en servant d'activateur à Spr0129-0131, de manière similaire à *T. maritima*.

YjeE d'*E. coli* est décrite comme une protéine essentielle en condition aérobie de croissance, mais dispensable en condition d'anaérobiose. Ceci suggère un rôle de YjeE dans la respiration aérobie. Lors de la déplétion de *yjeE*, toxique pour les cellules, l'expression de *rstA* s'avère suppressive du phénotype. RtsA code pour le régulateur de réponse du TCS RstAB, qui contrôle l'expression des gènes des voies respiratoires alternatives d'*E. coli* (Mangat & Brown, 2008). Cette observation suggère que les protéines de la famille UbK pourraient jouer un rôle dans la résistance au stress oxydatif. Chez *B. subtilis*, un mutant  $\Delta ydiB$  montre une sensibilité accrue au paraquat, qui génère des radicaux superoxydes dans le milieu (El-Khoury et al., 2020; Nguyen et al., 2017). Il a été démontré qu'une forme active d'UbK est nécessaire pour la survie de *B. subtilis* en conditions de stress oxydatif (El-Khoury et al., 2020). Nguyen et al. se sont intéressés à la protéine SodA, qui est essentielle en présence de paraquat et apparaît phosphorylée dans le phosphoprotéome de *B. subtilis*. Cependant, SodA n'est pas phosphorylée par YdiB *in vitro* chez *B. subtilis* (Nguyen et al., 2017). Ces données suggèrent qu'UbK de *S. pneumoniae* pourrait également jouer un rôle dans la résistance au stress

oxydatif. En ce sens, des observations préliminaires non présentées dans ma thèse montrent une sensibilité accrue au paraquat des mutants  $\Delta ubk$ , UbK K36R et Y58E. Ceci suggère donc une implication d'UbK dans la résistance au stress oxydatif, en lien avec ses activités d'hydrolyse de l'ATP et d'autophosphorylation. Chez le pneumocoque, la protéine SodA est impliquée dans la détoxification des radicaux superoxydes en eau oxygénée (Yesilkaya et al., 2013). Un mutant  $\Delta sodA$  chez le pneumocoque montre également une croissance affectée en présence de paraquat. Une perspective intéressante de travail sera donc d'étudier plus particulièrement le lien entre SodA et UbK, et évaluer si SodA est phosphorylée par UbK chez le pneumocoque.

Nous nous sommes interrogés sur la capacité de ComM, GNAT et LytR à être des substrats d'UbK (Figure 53). Au laboratoire, les protéines membranaires ComM et LytR ont été surproduites chez *E. coli* et isolées dans les vésicules de la membrane interne. La purification de ComM dans les vésicules n'a pas été concluante. LytR présente dans des vésicules membranaires n'est pas phosphorylée par Ubk *in vitro*. ComM et LytR pourraient toutefois être des partenaires d'UbK. Nous aborderons donc cette possibilité et suivrons également leur localisation en absence d'UbK.

La protéine cytoplasmique GNAT, codant pour une acétyltransférase présumée, s'avère phosphorylée par UbK *in vitro*. Nous n'avons cependant pas confirmé ce résultat *in vivo* en analysant par spectrométrie de masse la protéine de fusion GFP-GNAT purifiée à partir du pneumocoque. Il n'est cependant pas totalement exclu que GNAT puisse être phosphorylée sur d'autres résidus, ou que les conditions ne soient pas adéquates pour la révélation de cette phosphorylation.

L'analyse de la co-immunoprécipitation d'UbK par spectrométrie de masse, n'a pas révélé la présence de ComM, LytR ou GNAT comme partenaires éventuels d'UbK. Cependant, d'autres conditions pourraient permettre de visualiser une interaction entre ces protéines.

### **UbK contrôle la phase tardive de la compétence.**

L'opéron d'*ubk* contient un promoteur en amont de *comM* induit précocement lors de la compétence, et certainement un autre promoteur juste en amont d'*ubk* (Figure 53). Lors de

l'induction de la compétence, l'expression de *comM* est augmentée de 16 fois par rapport à son niveau basal, alors que celle des gènes en aval ne l'est que 8 fois (Peterson et al., 2004). Une étude récente montre que l'introduction d'un terminateur en aval de *comM* diminue conséquemment l'induction de *lytR* lors de la compétence (Bergé et al., 2017). Nous nous sommes intéressés au rôle d'UbK dans la compétence.

Nous avons démontré que l'expression d'UbK est constante au cours du cycle cellulaire, indépendamment de l'induction de la compétence. L'expression basale d'*ubk* serait essentiellement liée au promoteur se trouvant en amont, et semble prévaloir sur l'augmentation de transcription lors de la compétence décrite dans la littérature. Par ailleurs, UbK reste cytoplasmique, indépendamment de l'induction de la compétence. Ceci suggère qu'UbK agirait indépendamment de toute induction de la compétence.

Pour autant, nous nous sommes intéressés au rôle que pourrait jouer UbK sur le développement, lors des phases précoce et tardive de celle-ci.

L'utilisation du gène rapporteur *gfp* sous le contrôle du promoteur du gène précoce *comE* n'a pas révélé de différence d'expression en absence ou présence d'*ubk*, traduisant qu'UbK ne contrôle pas le développement, et donc l'initiation, de la phase précoce de compétence.

Cependant, l'utilisation du promoteur du gène tardif *ssbB* fusionné transcriptionnellement à *gfp*, montre qu'environ 30% des cellules du mutant  $\Delta ubk$  n'entrent pas en phase de compétence tardive. Ceci indique que la présence d'UbK est au moins pour partie nécessaire au développement de la compétence tardive. Comme l'absence d'*ubk* conduit à une altération de la croissance du pneumocoque, nous avons vérifié que le phénotype n'était pas lié à une compétence retardée. L'analyse par time-lapse nous indique par ailleurs que les cellules développant la compétence, deviennent toutes compétentes de manière synchrone. A l'inverse, les 30% de cellules ne développant pas la compétence tardive ne la développent jamais. Nous suspectons que seules les cellules de morphologies anormales du mutant  $\Delta ubk$  étaient incapables d'entrer en phase de compétence tardive. La morphologie s'est avérée ne pas être un critère discriminant.

Puisque nous n'avons pas détecté de différence d'expression d'UbK lors de l'induction de la compétence, nous avons voulu nous assurer que son rôle de contrôle de la compétence



tardive est effectivement indépendant de toute expression de son propre gène lors de la compétence. Nous avons utilisé un terminateur fort de la transcription, issu d'*E. coli*, positionné en aval de *comM*. Cette construction a déjà été utilisée chez le pneumocoque (Bergé et al., 2017). En présence des fusions  $P_{comE}\text{-gfp}$  ou  $P_{ssbB}\text{-gfp}$ , nous observons que l'ensemble de la population est fluorescent dans les mêmes proportions qu'en absence du terminateur. Ce résultat confirme que l'effet d'UbK sur la phase tardive de la compétence est indépendant de l'induction de son propre gène lors de la compétence. Nous n'observons d'ailleurs pas de différence significative de l'expression basale d'*ubk* ou lors de l'induction de la compétence en présence du terminateur. Ce résultat est cohérent avec nos précédentes observations d'une expression inchangée d'*ubk* au cours du cycle cellulaire. UbK, exprimée à un niveau stable et constant, pourrait donc agir comme un régulateur positif de la phase tardive de la compétence.

UbK pouvant contrôler la phase tardive de la compétence, nous nous sommes demandé si l'efficacité de transformation de mutants *ubk* est affectée. Nous avons déterminé que l'efficacité de transformation du mutant  $\Delta ubk$  était réduite de l'ordre de 30%. De plus, nous avons confirmé la diminution du taux de transformation par substitution de *ftsZ-stop-gfp* par *ftsZ-gfp* en microscopie en absence d'*ubk* d'environ 25%. La cohérence des résultats obtenus par ces deux approches montre qu'UbK contrôle *in fine* la transformation de l'ADN.

Nous avons montré que la protéine de la nucléase EndA est toujours recrutée au niveau du transformasome au milieu de la cellule et aux pôles en l'absence d'UbK. Ces premiers résultats tendent à indiquer que le phénotype du mutant  $\Delta ubk$  n'est pas lié au recrutement du transformasome. Le rôle d'UbK pourrait donc être directement lié aux étapes ultérieures du processus de transformation, par exemple au niveau de la recombinaison homologue de l'ADN transformant. Cependant, il est essentiel de considérer que l'ensemble des gènes tardifs de la compétence est sous le contrôle du facteur alternatif sigma X, issu des gènes *comX1* et *comX2* induits par ComE phosphorylée. Ce facteur est stabilisé par ComW, et dégradé par la protéase ClpP (Figure 18) (Sung & Morrison, 2005; Johnsborg & Håvarstein, 2009). Nous allons donc dorénavant prioritairement nous intéresser au fonctionnement et à la localisation de ces protéines en absence d'*ubk*. S'il s'avère qu'UbK exerce un contrôle sur l'une ou plusieurs de ces protéines, l'effet sur la transformation ne serait alors que la conséquence d'un contrôle global de l'expression des gènes tardifs de la compétence par UbK.

## **L'activité d'hydrolyse de l'ATP d'UbK module l'efficacité de la transformation.**

UbK étant une protéine-kinase, nous nous sommes intéressés au lien entre le contrôle exercé par UbK sur l'expression des gènes tardifs de la compétence et sa fonction protéine-kinase.

L'expression du promoteur de *ssbB*, n'est impactée chez aucun des mutants *ubk* (phosphomimétique, phosphoablatif et catalytique). Les taux de transformation des mutants phosphomimétique et phosphoablatif d'UbK ne sont également pas affectés. De manière surprenante, nous observons une légère diminution de l'efficacité de transformation pour le mutant catalytique d'UbK mais ces résultats demandent à être confirmés par transformation du mutant exprimant *ftsZ-stop-gfp*. L'expression des gènes tardifs de la compétence ne semble donc dépendre ni de l'activité kinase d'UbK ni de son activité d'hydrolyse de l'ATP.

Ces résultats sont en faveur de l'existence d'un (de) partenaire(s) d'UbK lors du développement de la compétence. La co-immunoprécipitation d'UbK en condition d'induction de la compétence n'a pas mis en évidence de partenaires. En effet, les bandes obtenues provenaient d'un collage à l'anticorps anti-GFP et/ou étaient issues de la dégradation des protéines (Figure 67). Cependant, une manière de détecter des partenaires dans ces conditions serait d'analyser l'intégralité de l'échantillon par spectrométrie de masse.

## **L'intégrité de la paroi est compromise en absence d'*ubk*.**

Nous avons montré que l'absence d'*ubk* chez le pneumocoque conduit à des cellules de forme anormale avec des défauts de la paroi (écaillages et cassures) et des septa mal positionnés (Figure 68). Ces données sont en faveur d'une altération du cycle cellulaire et d'une dérégulation de la machinerie de synthèse de la paroi.

Nous avons analysé la composition du peptidoglycane d'un mutant  $\Delta ubk$ . Nous avons mis en évidence une augmentation des pontages directs des tripeptides et des tetrapeptides, alors que les pontages indirects avec les dipeptides Ser-Ala ou Ala-Ala sont favorisés pour les pentapeptides. L'ensemble de ces modifications pourrait modifier la structure du peptidoglycane, ce qui serait à l'origine des cassures observées en microscopie électronique.

Lors de la synthèse du peptidoglycane dans le cytoplasme, l'ajout de branchements Ser-Ala ou Ala-Ala sur la L-Lysine, en troisième position du pentapeptide, est réalisé par les enzymes MurMN. Leur inactivation conduit à la production exclusive de mucopeptides linéaires, ce qui confère au pneumocoque la capacité de résister à des antibiotiques de type pénicilline (Filipe & Tomasz, 2000). En absence d'*ubk*, nous observons toujours la présence de mucopeptides branchés, même si les pentapeptides branchés sont favorisés au détriment des tripeptides et des tetrapeptides branchés. Ubk pourrait influencer négativement la fonction de MurMN, limitant la quantité de mucopeptides branchés dans le peptidoglycane. L'analyse par spectrométrie de masse des protéines co-purifiées avec UbK montre la présence des protéines membranaires MurM et MurN. Le lien entre ces protéines demandera à être confirmé par d'autres méthodes d'interaction. De plus, nous envisageons de déterminer l'activité de ces enzymes dans un mutant  $\Delta ubk$ .

D'autre part, les enzymes qui génèrent des tetrapeptides et des tripeptides à partir des pentapeptides sont les carboxypeptidases DacA et DacB respectivement. Les mutants *dacA* et *dacB* montrent des défauts dans la morphologie et la septation (Barendt et al., 2011). Ces phénotypes rappellent ceux obtenus dans un mutant  $\Delta ubk$ . Ainsi, nous pourrions suspecter une diminution de l'activité de DacA et DacB en absence d'*ubk* allant en faveur d'une augmentation de pentapeptides, ce qui suggère qu'UbK pourrait moduler positivement l'activité de ces enzymes. Ces enzymes pourraient être dérégulées ou délocalisées, ce qui engendrerait l'écaillage de la paroi observé en microscopie électronique. Il serait cependant intéressant d'effectuer une analyse quantitative plus aboutie pour déterminer les taux d'augmentation et de diminution de chaque type d'assemblage.

### **UbK et organisation de la machinerie de division.**

Les défauts de la paroi observés en microscopie électronique pourraient provenir de défauts de localisation et/ou d'activité des protéines impliquées dans la synthèse de la paroi. Nous avons donc marqué nos cellules avec un analogue fluorescent de la D-Ala, qui est incorporé dans le peptidoglycane par les PBPs.

Après marquage des cellules  $\Delta ubk$  pendant un court temps avec un analogue du D-Ala fluorescent (TDL), nous avons observé que les sites d'insertion du peptidoglycane sont

multiples et asymétriques. Ceci implique que le divisome, qui positionne et dirige la synthèse de la paroi, n'est pas complètement fonctionnel dans les cellules.

Nous nous sommes donc intéressés à la protéine majeure FtsZ qui constitue le divisome. Elle forme l'anneau Z au milieu de la cellule et permet le recrutement et la coordination des machineries de synthèse septale et périphérique (Pereira et al., 2011).

Nous observons que FtsZ montre une localisation plus diffuse, et parfois anormale en absence d'*ubk*. FtsZ possède la même temporalité de localisation aux sites de division et aux équateurs au cours du cycle cellulaire qu'une souche sauvage. Cependant, le signal est plus dispersé, ce qui suggère une instabilité du divisome au cours du cycle cellulaire, qui pourrait être responsable des défauts morphologiques d'un mutant  $\Delta ubk$ . Ces observations sont indépendantes d'une modulation potentielle de l'expression de FtsZ, qui est identique dans les cellules WT et les cellules  $\Delta ubk$ . De plus, nous avons mis en évidence une interaction *in vivo* entre UbK et FtsZ. Nous pouvons donc nous questionner sur la nature de l'interaction entre UbK et FtsZ. Une perspective intéressante serait de déterminer les causes moléculaires de ce défaut de localisation de FtsZ. Il sera ainsi intéressant de déterminer si l'absence d'*ubk* peut affecter la polymérisation de FtsZ et son ancrage à la membrane. Cette dernière hypothèse suggère que le dialogue moléculaire entre FtsZ et d'autres acteurs de la division cellulaire impliqués dans la stabilité de l'anneau Z et son ancrage à la membrane pourraient être affectés.

En accord avec ces hypothèses, nous avons montré par analyse en spectrométrie de masse que la protéine membranaire FtsA est un partenaire potentiel d'UbK (Mura et al., 2017). L'interaction d'UbK et FtsA devra cependant être confirmée par d'autres méthodes biochimiques (par MST par exemple). De manière intéressante, FtsA est décrite dans la littérature comme phosphorylée sur la Tyrosine 159 et la Thréonine 160, et comme un substrat *in vitro* de StkP (Burnside & Rajagopal, 2011; Sun et al., 2010). Nous n'avons cependant pas mis en évidence de phosphorylation de FtsA sur la Tyrosine *in vivo*, ni sur les sites de phosphorylation connus. Cependant, d'autres sites de phosphorylation ont été identifiés sur des Sérines et Thréonines, et demandent à être validés par une approche génétique. Nous avons également observé qu'en absence d'*ubk*, le profil de localisation de FtsA est aberrant. En effet, FtsA n'est pas capable de se maintenir au site de division au cours

du cycle cellulaire, et relocalise précocement aux futurs sites de division. Ce résultat suggère qu'UbK impacte la dynamique de localisation de FtsA, sans toutefois moduler l'expression de FtsA (Figure 73). La migration précoce de FtsA aux futurs sites de division pourrait altérer la stabilité de l'anneau Z, et ainsi tout le processus de constriction cellulaire, et conduire à des cellules malformées. En effet, l'absence précoce de FtsA au site de constriction pourrait déstabiliser l'anneau Z, impacter le recrutement de protéines tardives de la division et/ou perturber les interactions au septum (Lara et al., 2005; Mura et al., 2017). Ceci nous questionne donc sur la capacité de FtsZ à séparer les cellules filles en absence d'*ubk*. Nous envisageons donc de co-localiser FtsA et FtsZ dans un mutant *ubk*, et vérifier si la stabilité de leur interaction est responsable du défaut de morphologie observé.

La STPK StkP contrôle de nombreux facteurs du cycle cellulaire, et assure notamment la progression et la fermeture du septum avec le désassemblage de l'anneau Z par son interaction avec FtsZ et FtsA (Beilharz et al., 2012). Nous n'avons pas mis en évidence de phosphorylation entre StkP et UbK, mais avons cependant identifié StkP comme partenaire potentiel d'UbK par spectrométrie de masse. Un double mutant  $\Delta\text{stkP}\Delta\text{ubk}$  s'avère très sévèrement affecté pour sa croissance, plus encore qu'un mutant  $\Delta\text{ubk}$ , renforçant l'idée d'un lien fonctionnel entre ces deux protéines. Il est donc envisagé de suivre la localisation de StkP et sa dynamique au cours du cycle cellulaire en absence d'UbK.

### **UbK et réplication et/ou la ségrégation des chromosomes.**

Le cycle cellulaire est étroitement lié à la réplication et la ségrégation des chromosomes, afin d'assurer la présence d'une copie du matériel génétique dans chaque cellule fille. Nous avons observé à l'aide d'une fusion *hlpA-mKate2* et du DAPI, une molécule fluorescente qui fixe les adénines et thymine de l'ADN, que le nucléoïde montre une localisation diffuse, y compris dans les cellules sans anomalie morphologique du mutant  $\Delta\text{ubk}$ . Nous observons également des nucléoïdes fragmentés.

Afin de tester si ces défauts proviennent d'une anomalie de réplication, nous envisageons d'estimer le ratio *ori/ter* par PCR quantitative en temps réel dans les cellules du mutants  $\Delta\text{ubk}$  (Kjos & Veening, 2014; Mercy et al., 2019). De manière complémentaire, nous évaluerons également si Ubk affecte la ségrégation des chromosomes. Chez le pneumocoque,

le système Par(A)BS / SMC est responsable de la ségrégation (Minnen et al., 2011). Le complexe SMC, recruté au niveau de la plateforme ParB-*parS*, compacte et organise l'ADN pour la ségrégation des chromosomes. De plus, La protéine RocS est un acteur central de la ségrégation en interagissant avec la protéine ParB. RocS interagit également avec FtsZ afin de protéger le nucléoïde d'une constriction précoce (effet guillotine) (Mercy et al., 2019). La localisation de l'anneau Z, anormalement diffuse dans les mutants  $\Delta ubk$ , reflète peut-être la modification de l'interaction entre RocS et FtsZ dans ce contexte. Il serait donc intéressant de déterminer la localisation de l'ensemble de ces acteurs dans un mutant  $\Delta ubk$ .

### **Interconnexion d'UbK avec d'autres systèmes de phosphorylation ?**

Le pneumocoque possède une BYK CpsD, une STPK StkP et une UbK. Différentes observations suggèrent une interconnexion entre les réseaux de phosphorylation gouvernés par différentes protéine-kinases chez le pneumocoque.

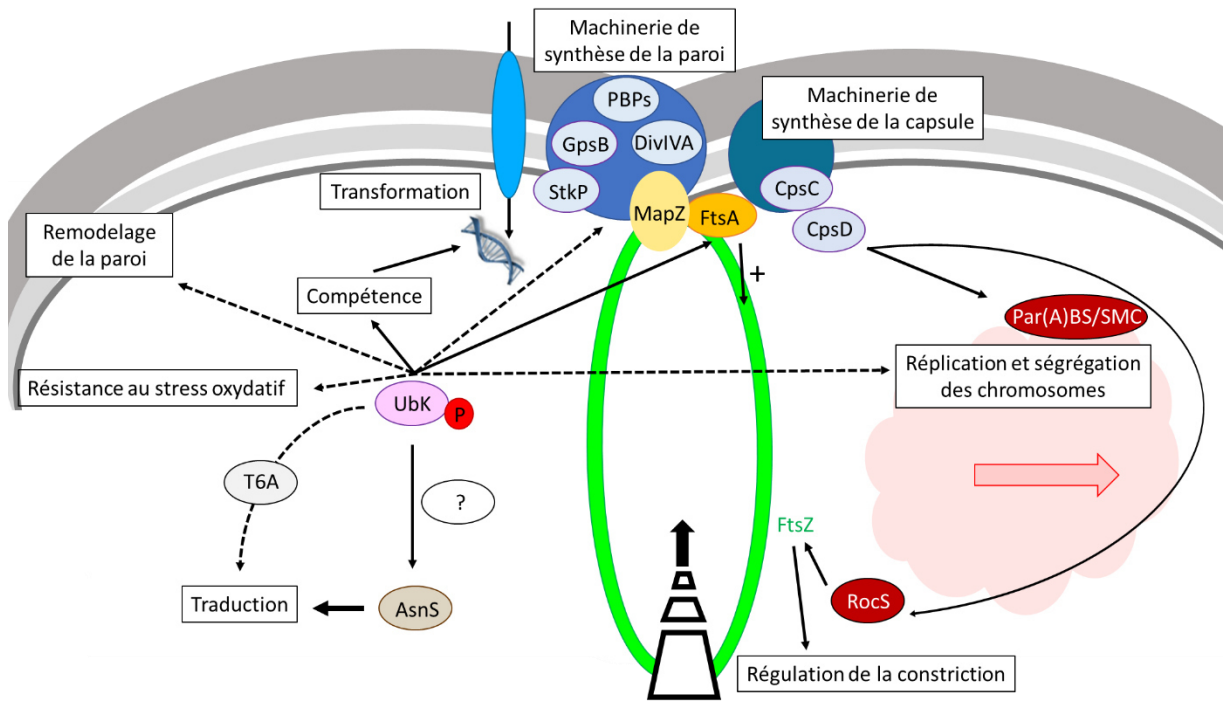
Bien que StkP soit une STPK de Hanks capable de s'autophosphoryler sur la Sérine et la Thréonine, il a été démontré par une étude de phosphoprotéomique qu'elle est phosphorylée sur la Tyrosine 587 (Sun et al., 2010). Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de phosphorylation de StkP par Ubk *in vitro*. Nous avons cependant identifié que StkP est un partenaire d'UbK, bien que cette interaction demande à être confirmée. De manière intéressante, un mutant  $\Delta stkP$  est partiellement insensible au CSP et voit l'expression des gènes tardifs de la compétence diminuée (Sasková et al., 2007). Ainsi, StkP joue un rôle de contrôle dans la compétence, tout comme UbK. Il serait intéressant d'explorer le lien entre ces deux protéines dans ces conditions, et notamment en étudiant les phénotypes du double mutant  $\Delta stkP \Delta ubk$ .

La même étude phosphoprotéomique a également démontré l'existence d'une centaine de substrats phosphorylés sur la Sérine, la Thréonine et la Tyrosine (Sun et al., 2010). Ceci suggère que d'autres protéine-kinases, « cryptiques », restent à identifier. De plus, un phosphoprotéome correspond à une sorte « d'arrêt sur image » lié aux conditions de l'expérimentation. La réalisation d'un phosphoprotéome du mutant  $\Delta ubk$ , permettrait certainement de relier certaines protéine-substrats phosphorylés à la protéine-kinase UbK.

## **Modèle de fonctionnement d'UbK.**

Nos résultats montrent qu'UbK est une autotyrosine protéine-kinase impliquée dans diverses fonctions chez le pneumocoque (Figure 72). Ainsi, Ubk influencerait la croissance et la morphologie cellulaire, le fonctionnement du divisome, la biologie du chromosome et l'expression de gènes tardifs de compétence. UbK pourrait être impliquée dans d'autres processus cellulaires qui nécessitent une exploration plus aboutie, comme la modulation de la traduction *via* le contrôle de la voie de biosynthèse du t<sup>6</sup>A responsable de la formation de la boucle anticodon des ARNt, ou encore dans la résistance au stress oxydatif. Enfin, UbK pourrait également impacter d'autres réseaux de phosphorylation dans la cellule, qui impliquent les kinases StkP et CpsD. L'ensemble de ces observations et hypothèses est repris dans la Figure 72.

La fonction d'UbK reste partiellement énigmatique, comme pour les autres protéine-kinases StkP et CpsD, et nécessite des travaux additionnels pour comprendre son rôle exact.



**Figure 72 : Modèle de fonctionnement d'UbK chez le pneumocoque.** UbK (ovale rose) s'autophosphoryle sur une Tyrosine (cercle rouge « P »). UbK est liée fonctionnellement à AsnS (ovale marron) qui est impliquée dans la traduction par l'intermédiaire de partenaires (ovale blanc « ? »). UbK pourrait également être impliquée dans la voie de biosynthèse de l'ARNt modifié T6A (ovale gris) et dans la résistance au stress oxydatif. UbK joue un rôle dans la compétence tardive et impacte la transformation bactérienne. L'ADN (double brin bleu) rentre dans la cellule par le transformasome (ovale bleu) et est éventuellement intégré au chromosome par recombinaison homologue. UbK interagit avec FtsZ (anneau vert) et la protéine d'ancrage à la membrane FtsA (ovale orange), et participe à la coordination de la synthèse de la paroi avec la division (cercle bleu clair) et notamment la duplication et la répartition de l'ADN (nuage rouge) dans chaque cellule fille. Les différents acteurs impliqués dans le métabolisme de l'ADN sont représentés par des ovales rouges, et ceux impliqués dans la biosynthèse de la paroi par des ovales bleus clairs. Les deux autres protéines-kinases StkP et CpsD sont représentées pour rendre compte d'une éventuelle communication croisée entre réseaux de phosphorylation. Les flèches en pointillées correspondent à des liens hypothétiques avec UbK.





# Références bibliographiques



- Adams, D. W., & Errington, J. (2009). Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2198>
- Alvarez, A. F., Barba-Ostria, C., Silva-Jiménez, H., & Georgellis, D. (2016). Organization and mode of action of two component system signaling circuits from the various kingdoms of life. *Environmental Microbiology*, *18*(10), 3210–3226. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13397>
- Andrews, L. D., Graham, J., Snider, M. J., & Fraga, D. (2008). *Characterization of a novel bacterial arginine kinase from Desulfotalea psychrophila*. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.03.017>
- Annik, J. M. ", Castillo, D. E., Yang, D., Siopsis, G., & Annik, J. M. ". (2016). The role of MatP, ZapA and ZapB in chromosomal organization and dynamics in Escherichia coli. *Nucleic Acids Research*, *44*(3), 1216–1226. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1484>
- Attaiech, L., Olivier, A., Mortier-Barrière, I., Soulet, A.-L., & Granadel, C. (2011). Role of the Single-Stranded DNA-Binding Protein SsbB in Pneumococcal Transformation: Maintenance of a Reservoir for Genetic Plasticity. *PLoS Genet*, *7*(6), 1002156. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002156>
- Austrian, R. (1981). Pneumococcus: The First One Hundred Years. *Reviews of Infectious Diseases*, *3*(2), 183–189. <https://doi.org/10.1093/CLINIDS/3.2.183>
- Avery, O. T., Macleod, C. M., & McCarty, M. (1943). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. In *Journal of Experimental Medicine*, *79*(2):137-58.
- Badrinarayanan, A., Le, T. B., & Laub, M. T. (2015). Bacterial chromosome organization and segregation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125211>
- Bai, X.-H., Chen, H.-J., Jiang, Y.-L., Wen, Z., Huang, Y., Cheng, W., Li, Q., Qi, L., Zhang, J.-R., Chen, Y., & Zhou, C.-Z. (2014). *Structure of Pneumococcal Peptidoglycan Hydrolase LytB Reveals Insights into the Bacterial Cell Wall Remodeling and Pathogenesis* \*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.579714>
- Balachandran, P., Hollingshead, S. K., Paton, J. C., & Briles, D. E. (2001). The autolytic enzyme lytA of Streptococcus pneumoniae is not responsible for releasing pneumolysin. *Journal of Bacteriology*, *183*(10), 3108–3116. <https://doi.org/10.1128/JB.183.10.3108-3116.2001>
- Barendt, S. M., Sham, L.-T., & 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. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, *193*(9), 2290–2300. <https://doi.org/10.1128/JB.01555-10>
- Barthe, P., Mukamolova, G. v, Roumestand, C., & Cohen-Gonsaud, M. (2010). The Structure of PknB Extracellular PASTA Domain from Mycobacterium tuberculosis Suggests a Ligand-Dependent Kinase Activation. *Structure/Folding and Design*, *18*, 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.02.013>
- Bartholomew, J. W., & Mittwer, T. (1952). The Gram stain. In *Bacteriological Review*, *16*(1):1-29.
- Bartual, S. G., Straume, D., Anita Stamsås, G., Muñoz, I. G., Alfonso, C., Martínez-Ripoll, M., Sigve Håvarstein, L., & Hermoso, J. A. (2014). *Structural basis of PcsB-mediated cell separation in Streptococcus pneumoniae*. In *Nature Communications*, *5*:3842. <https://doi.org/10.1038/ncomms4842>
- Bäsell, K., Otto, A., Junker, S., Zühlke, D., Rappen, G.-M., Schmidt, S., Hentschker, C., Macek, B., Ohlsen, K., Hecker, M., & Becher, D. (2014). The phosphoproteome and its physiological dynamics in

*Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 304, 121–132.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.11.020>

- Bechet, E., Gruszczuk, J., Terreux, R., Gueguen-Chaignon, V., Vigouroux, A., Obadia, B., Cozzone, A. J., Nessler, S., & Grangeasse, C. (2010). Identification of structural and molecular determinants of the tyrosine-kinase Wzc and implications in capsular polysaccharide export. *Molecular Microbiology*, 77(5), 1315–1325. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07291.x>
- Bechet, E., Guiral, S., Torres, S., Mijakovic, I., Cozzone, A. J., & Grangeasse, C. (2009). Tyrosine-kinases in bacteria: From a matter of controversy to the status of key regulatory enzymes. *Amino Acids*, 37(3), 499–507. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0237-8>
- Becker, H. D., & Kern, D. (1998). *Thermus thermophilus*: A link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(22), 12832–12837. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.22.12832>
- Beilharz, K., Nováková, L., Fadda, D., Branny, P., Massidda, O., & Veening, J.-W. (2012). Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 109(15):E905-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119172109>
- Bentley, S. D., Aanensen, D. M., Mavroidi, A., Saunders, D., Rabinowitsch, E., Collins, M., Donohoe, K., Harris, D., Murphy, L., Quail, M. A., Samuel, G., Skovsted, I. C., Kalltoft, M. S., Barrell, B., Reeves, P. R., Parkhill, J., & Spratt, B. G. (2006). Genetic Analysis of the Capsular Biosynthetic Locus from All 90 Pneumococcal Serotypes. *PLoS Genet*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020031>
- Berg, K. H., Stamsås, G. A., Straume, D., & Håvarstein, L. S. (2013). Effects of low PBP2b levels on cell morphology and peptidoglycan composition in streptococcus pneumoniae R6. *Journal of Bacteriology*, 195(19), 4342–4354. <https://doi.org/10.1128/JB.00184-13>
- Bergé, M. J., Kamgoué, A., Martin, B., Polard, P., Campo, N., & Claverys, J.-P. (2013). Midcell recruitment of the DNA uptake and virulence nuclease, EndA, for pneumococcal transformation. *PLoS Pathogens*, 9(9), e1003596. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003596>
- Bergé, M. J., Mercy, C., Mortier-Barrière, I., Vannieuwenhze, M. S., Brun, Y. v, Grangeasse, C., Polard, P., & Campo, N. (2017). A programmed cell division delay preserves genome integrity during natural genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. In *Nature Communications*, 8(1):1621. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01716-9>
- Bisson-Filho, A. W., Hsu, Y. P., Squyres, G. R., Kuru, E., Wu, F., Jukes, C., Sun, Y., Dekker, C., Holden, S., VanNieuwenhze, M. S., Brun, Y. v., & Garner, E. C. (2017). Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science*, 355(6326), 739–743. <https://doi.org/10.1126/science.aak9973>
- Boitel, B., Ortiz-Lombardía, M., Durán, R., Pompeo, F., Cole, S. T., Cerveñansky, C., & Alzari, P. M. (2003). PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and dephosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase, in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, 49(6), 1493–1508. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03657.x>
- Bonnet, J., Durmort, C., Mortier-Barrière, I., Campo, N., Jacq, M., Moriscot, C., Straume, D., Berg, K. H., Håvarstein, L., Wong, Y. S., Vernet, T., & di Guilmi, A. M. (2018). Nascent teichoic acids insertion into the cell wall directs the localization and activity of the major pneumococcal autolysin LytA. *Cell Surface*, 2, 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2018.05.001>

- Bonnet, Julie, Durmort, C., Jacq, M., Mortier-Barrière, I., Campo, N., VanNieuwenhze, M. S., Brun, Y. v., Arthaud, C., Gallet, B., Moriscot, C., Morlot, C., Vernet, T., & di Guilmi, A. M. (2017). Peptidoglycan O-acetylation is functionally related to cell wall biosynthesis and cell division in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, *106*(5), 832–846. <https://doi.org/10.1111/mmi.13849>
- Bretl, D. J., Demetriadou, C., & Zahrt, T. C. (2011). Adaptation to Environmental Stimuli within the Host: Two-Component Signal Transduction Systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *75*(4), 566–582. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05004-11>
- Brückner, R., & Titgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters*, *209*(2), 141–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11123.x>
- Bruslind, L. (2019). Bacteria - Cell walls. In *Microbiology*. <https://bio.libretexts.org/link?10632>
- Bryant, J. C., Dabbs, R. C., Oswald, K. L., Brown, L. R., Rosch, J. W., Seo, K. S., Donaldson, J. R., McDaniel, L. S., & Thornton, J. A. (2016). Pyruvate oxidase of *Streptococcus pneumoniae* contributes to pneumolysin release. *BMC Microbiology*, *16*(1), 271. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0881-6>
- BULLOCK, & O., W. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques*, *5*, 376–379. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10005191117>
- Burghout, P., Bootsma, H. J., Kloosterman, T. G., Bijlsma, J. J. E., de Jongh, C. E., Kuipers, O. P., & Hermans, P. W. M. (2007). Search for genes essential for pneumococcal transformation: The RadA DNA repair protein plays a role in genomic recombination of donor DNA. *Journal of Bacteriology*, *189*(18), 6540–6550. <https://doi.org/10.1128/JB.00573-07>
- Burnside, K., & Rajagopal, L. (2011). *Regulation of prokaryotic gene expression by eukaryotic-like enzymes*. In *Current Opinion in Microbiology*, *15*(2):125-31. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.12.006>
- Cain, J. A., Solis, N., & Cordwell, S. J. (2013). *Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria*. In *Journal of Proteomics*, *97*:265-86. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.08.012>
- Caldas, P., López-Pelegrín, M., Pearce, D. J. G., Burak Budanur, N., Brugués, J., & Loose, M. (2019). Cooperative ordering of treadmilling filaments in cytoskeletal networks of FtsZ and its crosslinker ZapA. In *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13702-4>
- Calix, J. J., Porambo, R. J., Brady, A. M., Larson, T. R., Yother, J., Abeygunwardana, C., & Nahm, M. H. (2012). Biochemical, genetic, and serological characterization of two capsule subtypes among *Streptococcus pneumoniae* serotype 20 strains: Discovery of a new pneumococcal serotype. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(33), 27885–27894. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.380451>
- Carvalho, S. M., Andisi, F., Gradstedt, V., Neef, H., & Kuipers, J. P. (2013). Pyruvate Oxidase Influences the Sugar Utilization Pattern and Capsule Production in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS ONE*, *8*(7), 68277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068277>
- Chung, K.-M., Hsu, H.-H., Yeh, H.-Y., & Chang, B.-Y. (2006). Mechanism of Regulation of Prokaryotic Tubulin-like GTPase FtsZ by Membrane Protein EzrA. *Journal of Biological Chemistry*, *282*, 14891–14897. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605177200>
- Claessen, D., Emmins, R., Hamoen, L. W., Daniel, R. A., Errington, J., & Edwards, D. H. (2008). Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *68*(4), 1029–1046. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06210.x>

- Claudiani, S., & Apperley, J. F. (2018). The argument for using imatinib in CML. *Hematology*, 2018(1), 161–167. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2018.1.161>
- 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., Oakley, A. J., Vollmer, W., & Lewis, R. J. (2014). Structure and function of a spectrin-like regulator of bacterial cytokinesis. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6421>
- Cleverley, R. M., Rutter, Z. J., Rismondo, J., Corona, F., Tsui, H.-C. T., Alatawi, F. A., Daniel, R. A., Halbedel, S., Massidda, O., Winkler, M. E., & Lewis, R. J. (2019). *The cell cycle regulator GpsB functions as cytosolic adaptor for multiple cell wall enzymes*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08056-2>
- Cohen, P. (2002). The origins of protein phosphorylation. In *Nature Cell Biology* (Vol. 4). <http://cellbio.nature.comE127>
- Collins, R. F., Beis, K., Clarke, B. R., Ford, R. C., Hulley, M., Naismith, J. H., & Whitfield, C. (2006). Periplasmic Protein-Protein Contacts in the Inner Membrane Protein Wzc Form a Tetrameric Complex Required for the Assembly of Escherichia coli Group 1 Capsules\* Europe PMC Funders Group. *J Biol Chem*, 281(4), 2144–2150. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508078200>
- Cowley, S., Ko, M., Pick, N., Chow, R., Downing, K. J., Gordhan, B. G., Betts, J. C., Mizrahi, V., Smith, D. A., Stokes, R. W., & Av-Gay, Y. (2004). The Mycobacterium tuberculosis protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth in vivo. *Molecular Microbiology*, 52(6), 1691–1702. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04085.x>
- Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Hénard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., Martin, B., Wells, J., & Claverys, J. P. (2004). Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in Streptococcus pneumoniae: Competence triggers stationary phase autolysis of ciaR mutant cells. *Molecular Microbiology*, 51(4), 1071–1086. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03892.x>
- Damle, N. P., & Mohanty, D. (2014). *Mechanism of Autophosphorylation of Mycobacterial PknB Explored by Molecular Dynamics Simulations*. In *Biochemistry*, 53(28):4715-26. <https://doi.org/10.1021/bi500245v>
- de Las Rivas, B., Rivas, L., García, J. L., López, R., & García, P. (2002). Purification and Polar Localization of Pneumococcal LytB, a Putative Endo-N-Acetylglucosaminidase: the Chain-Dispersing Murein Hydrolase. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 184(18), 4988–5000. <https://doi.org/10.1128/JB.184.18.4988-5000.2002>
- Denapaite, D., Brückner, R., Hakenbeck, R., & Vollmer, W. (2012). Biosynthesis of Teichoic Acids in *Streptococcus pneumoniae* and Closely Related Species: Lessons from Genomes. *Microbial Drug Resistance*, 18(3), 344–358. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0026>
- Desai, B. v., & Morrison, D. A. (2007). Transformation in *Streptococcus pneumoniae* : formation of eclipse complex in a *coiA* mutant implicates CoiA in genetic recombination. *Molecular Microbiology*, 63(4), 1107–1117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05558.x>
- Deutsch, C., el Yacoubi, B., de Crécy-Lagard, V., & Iwata-Reuyl, D. (2012). Biosynthesis of threonylcarbamoyl adenosine (t6A), a universal tRNA nucleoside. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 13666–13673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.344028>

- Deutscher, J., Kessler, U., Alpert, C. A., & Hengstenberg, W. (1984). Bacterial Phosphoenolpyruvate-Dependent Phosphotransferase System: P-Ser-HPr and Its Possible Regulatory Function. *Biochemistry*, 23(19), 4455–4460. <https://doi.org/10.1021/bi00314a033>
- Deutscher, Josef, Moussan, F., Aké, D., Derkaoui, M., Constant Zébré, A., Cao, T. N., Bouraoui, H., Kentache, T., Mokhtari, A., Milohanic, E., & Joyet, P. (2014). *The Bacterial Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System: Regulation by Protein Phosphorylation and Phosphorylation-Dependent Protein-Protein Interactions*. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00001-14>
- Dewar, J. M., & Walter, J. C. (2017). Mechanisms of DNA replication termination. *Nat Rev Mol Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.42>
- Dong, C., Beis, K., Nesper, J., Brunkan, A. L., Clarke, B. R., Whitfield, C., & Naismith, J. H. (2006). *The structure of Wza, the translocon for group 1 capsular polysaccharides in Escherichia coli, identifies a new class of outer membrane protein*. <https://doi.org/10.1038/nature05267>
- Dorsey-Oresto, A., Lu, T., Mosel, M., Wang, X., Salz, T., Drlica, K., & Zhao, X. (2013). YihE kinase is a central regulator of programmed cell death in bacteria. *Cell Rep*, 3(2), 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.01.026>
- Du, S., & Lutkenhaus, J. (2012). MipZ: One for the Pole, Two for the DNA. In *Molecular Cell* (Vol. 46, Issue 3, pp. 239–240). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.04.024>
- Du, S., & Lutkenhaus, J. (2019). *At the Heart of Bacterial Cytokinesis: The Z Ring*. In *Trends in Microbiology*, 27(9):781-791. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.04.011>
- Ducret, A., & Grangeasse, C. (2017). Bacterial physiology: Wrapping the cell in a CozE shell. In *Nature Microbiology* (Vol. 2, Issue 3). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.262>
- Ducret, A., & Grangeasse, C. (2021). Recent progress in our understanding of peptidoglycan assembly in Firmicutes. *Current Opinion in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.01.011>
- Ducret, A., Quardokus, E. M., & Brun, Y. v. (2016). MicrobeJ, a tool for high throughput bacterial cell detection and quantitative analysis. *Nature Microbiology*, 1(7). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.77>
- Dworkin, J. (2015). Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria HHS Public Access. *Curr Opin Microbiol*, 24, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.005>
- Eberhardt, A., Hoyland, C. N., Vollmer, D., Bisle, S., Cleverley, R. M., Johnsborg, O., Hå, L. S., Lewis, R. J., & Vollmer, W. (2012). *Attachment of Capsular Polysaccharide to the Cell Wall in Streptococcus pneumoniae*. <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0232>
- Eberhardt, A., Hoyland, C. N., Vollmer, D., Bisle, S., Cleverley, R. M., Johnsborg, O., Håvarstein, L. S., Lewis, R. J., & Vollmer, W. (2012). Attachment of Capsular Polysaccharide to the Cell Wall in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Drug Resistance*, 18(3), 240–255. <https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0232>
- Egan, A. J. F., Errington, J., & Vollmer, W. (2020). Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nat Rev Microbiol*. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0366-3>
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Straume, D., Ohnstad, H. S., Berg, K. H., Hermoso, J. A., & Håvarstein, L. S. (2010). Pneumococcal CbpD is a murein hydrolase that requires a dual cell envelope binding



- specificity to kill target cells during fratricide. *Molecular Microbiology*, 76(4), 905–917. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07143.x>
- Elsholz, A. K. W., Wacker, S. A., & Losick, R. (2014). *Self-regulation of exopolysaccharide production in Bacillus subtilis by a tyrosine kinase*. In *Genes and Development*, 28(15):1710-20. <https://doi.org/10.1101/gad.246397.114>
- Fadda, D., Pischedda, C., Caldara, F., Whalen, M. B., Anderluzzi, D., Domenici, E., & Massidda, O. (2003). Characterization of divIVA and Other Genes Located in the Chromosomal Region Downstream of the dcw Cluster in Streptococcus pneumoniae. *Journal of Bacteriology*, 185(20), 6209–6214. <https://doi.org/10.1128/JB.185.20.6209-6214.2003>
- Falk, S. P., & Weisblum, B. (2013). *Phosphorylation of the Streptococcus pneumoniae cell wall biosynthesis enzyme MurC by a eukaryotic-like Ser/Thr kinase*. In *FEMS Microbiology Letter*, 340(1):19-23. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12067>
- Fenton, A. K., el Mortaji, L., C Lau, D. T., Rudner, D. Z., Bernhardt, T. G. (2017). *CozE is a member of the MreCD complex that directs cell elongation in Streptococcus pneumoniae*. In *Nature Microbiology*, 2:16237. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.237>
- Fenton, A. K., Manuse, S., Flores-Kim, J., Garcia, P. S., Mercy, C., Grangeasse, C., Bernhardt, T. G., & Rudner, D. Z. (2018). Phosphorylation-dependent activation of the cell wall synthase PBP2a in Streptococcus pneumoniae by MacP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(11), 2812–2817. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715218115>
- Filipe, S. R., Pinho, M. G., & Tomasz, A. (2000). Characterization of the murMN operon involved in the synthesis of branched peptidoglycan peptides in Streptococcus pneumoniae. *Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 27768–27774. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004675200>
- Filipe, S. R., Severina, E., & Tomasz, A. (2001). Functional Analysis of Streptococcus pneumoniae MurM Reveals the Region Responsible for Its Specificity in the Synthesis of Branched Cell Wall Peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39618–39628. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106425200>
- Filipe, S. R., & Tomasz, A. (2000). Inhibition of the expression of penicillin resistance in Streptococcus pneumoniae by inactivation of cell wall mucopeptide branching genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), 4891–4896. <https://doi.org/10.1073/pnas.080067697>
- Fleurie, A., Cluzel, C., Guiral, S., Freton, C., Galisson, F., Zanella-Cleon, I., di Guilmi, A.-M., & Grangeasse, C. (2012). Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of Streptococcus pneumoniae. *Molecular Microbiology*, 83(4), 746–758. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07962.x>
- Fleurie, A., Lesterlin, C., Manuse, S., Zhao, C., Cluzel, C., Lavergne, J. P., Franz-Wachtel, M., MacEk, B., Combet, C., Kuru, E., VanNieuwenhze, M. S., Brun, Y. v., Sherratt, D., & Grangeasse, C. (2014a). MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in Streptococcus pneumoniae. *Nature*, 516(7530), 260–262. <https://doi.org/10.1038/nature13966>
- Fleurie, A., Manuse, S., Zhao, C., Campo, N., Cluzel, C., Lavergne, J.-P., Freton, C., Combet, C., Guiral, S., Soufi, B., Macek, B., Kuru, E., VanNieuwenhze, M. S., Brun, Y. v., di Guilmi, A.-M., Claverys, J.-P., Galinier, A., & Grangeasse, C. (2014b). Interplay of the Serine/Threonine-Kinase StkP and the Paralogs DivIVA and GpsB in Pneumococcal Cell Elongation and Division. *PLoS Genetics*, 10(4), e1004275. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004275>

- Gaidenko, T. A., Kim, T.-J., & Price, C. W. (2002). The PrpC Serine-Threonine Phosphatase and PrkC Kinase Have Opposing Physiological Roles in Stationary-Phase *Bacillus subtilis* Cells. *Journal of Bacteriology*, *184*(22), 6109–6114. <https://doi.org/10.1128/JB.184.22.6109-6114.2002>
- Galinier, A., & Deutscher, J. (2017). *Sophisticated Regulation of Transcriptional Factors by the Bacterial Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System*. In *Journal of Molecular Biology*, *429*(6):773-789. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.02.006>
- Galli, E., & Gerdes, K. (2010). Spatial resolution of two bacterial cell division proteins: ZapA recruits ZapB to the inner face of the Z-ring. *Molecular Microbiology*, *76*(6), 1514–1526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07183.x>
- Gao, R., Mack, T. R., & Stock, A. M. (2007). *Bacterial Response Regulators: Versatile Regulatory Strategies from Common Domains*. In *Trends of Biochemical Sciences*, *32*(5):225-34. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete\\_Genomes/SignalCensus.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/SignalCensus.html)
- García, E., García, J. L., Ronda, C., García, P., & López, R. (1985). Cloning and expression of the pneumococcal autolysin gene in *Escherichia coli*. *Molecular & General Genetics : MGG*, *201*(2), 225–230. <https://doi.org/10.1007/bf00425663>
- Geno, K. A., Gilbert, G. L., Song, J. Y., Skovsted, I. C., Klugman, K. P., Jones, C., Konradsen, H. B., & Nahm, M. H. (2015). Pneumococcal capsules and their types: Past, present, and future. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 871–899. <https://doi.org/10.1128/CMR.00024-15>
- Getz, L. J., Runte, C. S., Rainey, J. K., & Thomas, N. A. (2019). Tyrosine phosphorylation as a widespread regulatory mechanism in prokaryotes. In *Journal of Bacteriology* (Vol. 201, Issue 19). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/JB.00205-19>
- Giefing, C., Jelencsics, K. E., Gelbmann, D., Senn, B. M., & 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*(6), 1697–1707. <https://doi.org/10.1099/mic.0.036335-0>
- Gómez-Mejía, A., Gámez, G., & Hammerschmidt, S. (2017). *Streptococcus pneumoniae two-component regulatory systems: The interplay of the pneumococcus with its environment*. In *International Journal of Medical Microbiology*, *308*(6):722-737. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.012>
- Gordon, E., Mouz, N., Due, E., & Dideberg, O. (2000). *The Crystal Structure of the Penicillin-binding Protein 2x from Streptococcus pneumoniae and its Acyl-enzyme Form: Implication in Drug Resistance*. In *Journal of Molecular Biology*, *299*(2):477-85. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3740>
- Grangeasse, C, Cozzone, A. J., Deutscher, J., & Mijakovic, I. (2007). Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends in Biochemical Sciences*, *32*(2), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.12.004>
- Grangeasse, C, Doublet, P., Vaganay, E., Vincent, C., Delé, G., Age, D., Duclos, B., & Cozzone, A. J. (1997). Characterization of a bacterial gene encoding an autophosphorylating protein tyrosine kinase. In *Gene* (Vol. 204).
- Grangeasse, Christophe. (2016). Rewiring the Pneumococcal Cell Cycle with Serine/Threonine- and Tyrosine-kinases. *Trends in Microbiology*, *24*(9). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.04.004>
- Grangeasse, Christophe, Doublet, P., Vincent Elisabeth Vaganay, C., Á ne Riberty, M., Duclos, B., & Cozzone, A. J. (1998). *Functional Characterization of the Low-molecular-mass Phosphotyrosine-protein Phosphatase of Acinetobacter johnsonii*. In *Journal of Molecular Biology*, *278*(2):339-47.

- Grangeasse, Christophe, Nessler, S., & Mijakovic, I. (2012). *Bacterial tyrosine kinases: evolution, biological function and structural insights*. In *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Serie B, Biological Sciences*, 367(1602):2640-55. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0424>
- Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *Journal of Hygiene*, 27(2), 113–159. <https://doi.org/10.1017/S0022172400031879>
- Habib, M., Porter, B. D., & Satzke, C. (2014). Capsular serotyping of *Streptococcus pneumoniae* using the quellung reaction. *Journal of Visualized Experiments*, 84, e51208. <https://doi.org/10.3791/51208>
- Hakenbeck, R., Balmelle, N., Weber, B., Gardès, C., Keck, W., & de Saizieu, A. (2001). Mosaic genes and mosaic chromosomes: Intra- and interspecies genomic variation of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 69(4), 2477–2486. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2477-2486.2001>
- Hakenbeck, Regine, Brückner, R., Denapate, D., & Maurer, P. (2012). Molecular mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. In *Future Microbiology* (Vol. 7, Issue 3, pp. 395–410). <https://doi.org/10.2217/fmb.12.2>
- Hamoen, L. W., Meile, J. C., de Jong, W., Noiro, P., & Errington, J. (2006). SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. *Molecular Microbiology*, 59(3), 989–999. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04987.x>
- Hanks, S K, & Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(8), 576–596. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7768349>
- Hanks, Steven K, Marie Quinn, A., & Hunter, T. (1988). The Protein Kinase Family: Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains. In *Faraday Discuss. Chem. Soc* (Vol. 82). Oxford Univ. Press. <http://science.sciencemag.org/>
- Hausmann, C. D., & Ibba, M. (2008). Aminoacyl-tRNA Synthetase Complexes: Molecular Multitasking Revealed. *Biochemistry*, 15(12), 1555–1566. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00119.x>.Aminoacyl-tRNA
- Håvarstein, L. S., Hakenbeck, R., & Gaustad, P. (1997). Natural competence in the genus *Streptococcus*: Evidence that streptococci can change phenotype by interspecies recombinational exchanges. *Journal of Bacteriology*, 179(21), 6589–6594. <https://doi.org/10.1128/jb.179.21.6589-6594.1997>
- Håvarstein, L. S., Martin, B., Johnsborg, O., Granadel, C., & Claverys, J. P. (2006). New insights into the pneumococcal fratricide: Relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1297–1307. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05021.x>
- Henriques, M. X., Rodrigues, T., Carido, M., Ferreira, L., & Filipe, S. R. (2011). Synthesis of capsular polysaccharide at the division septum of *Streptococcus pneumoniae* is dependent on a bacterial tyrosine kinase. *Molecular Microbiology*, 82(2), 515–534. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07828.x>
- Henriques-Normark, B., & Normark, S. (2010). Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. *Experimental Cell Research*, 316, 1408–1414. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.03.003>

- Holečková, N., Doubravová, L., Massidda, O., Molle, V., Buriánková, K., Benada, O., Kofroň, O., Ulrych, A., & Branny, P. (2014). *LocZ Is a New Cell Division Protein Involved in Proper Septum Placement in Streptococcus pneumoniae*. <https://doi.org/10.1128/mBio.01700-14>
- Hosek, T., Bougault, M., Lavergne, J.-P., Martinez, D., Ayala, I., Fenel, D., Restelli, M., Morlot, C., Habenstein, B., Grangeasse, C., & Simorre, J.-P. (2020). *Structural features of the interaction of MapZ with ftsZ and membranes in Streptococcus pneumoniae*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61036-9>
- Hsu, Y.-P., Rittichier, J., Kuru, E., Yablonowski, J., Pasciak, E., Tekkam, S., Hall, E., Murphy, B., Lee, T. K., Garner, E. C., Huang, K. C., Brun, Y. v, & Vannieuwenhze, M. S. (2017). *Full color palette of fluorescent D-amino acids for in situ labeling of bacterial cell walls*. <https://doi.org/10.1039/c7sc01800b>
- Hunter, T. (2014). *The Genesis of Tyrosine Phosphorylation*. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5):a020644. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020644>
- Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J. M., Bax, K., & Brown, J. S. (2010). The Streptococcus pneumoniae capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infection and Immunity*, 78(2), 704–715. <https://doi.org/10.1128/IAI.00881-09>
- Iftiaf, A., Ud-Din, S., Tikhomirova, A., & Roujeinikova, A. (2016). *Molecular Sciences Structure and Functional Diversity of GCN5-Related N-Acetyltransferases (GNAT)*. In *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7):1018. <https://doi.org/10.3390/ijms17071018>
- Jacobs, M. R., Koornhof, H. J., Robins-Browne, R. M., Stevenson, C. M., Vermaak, Z. A., Freiman, I., Miller, G. B., Witcomb, M. A., Isaäcson, M., Ward, J. I., & Austrian, R. (1978). Emergence of Multiply Resistant Pneumococci. *New England Journal of Medicine*, 299(14), 735–740. <https://doi.org/10.1056/NEJM197810052991402>
- Jacq, M., Adam, V., Bourgeois, D., Moriscot, C., Guilmi, A.-M. di, Vernet, T., Morlot, C., & Harwood, C. S. (2014). Remodeling of the Z-Ring Nanostructure during the Streptococcus pneumoniae Cell Cycle Revealed by Photoactivated Localization Microscopy. *Bioorg Chem*, 55, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2014.03.007>
- Jacq, M., Arthaud, C., Manuse, S., Mercy, C., Bellard, L., Peters, K., Gallet, B., Galindo, J., Doan, T., Vollmer, W., Brun, Y. v, Vannieuwenhze, M. S., Marie, A., Guilmi, D., Vernet, T., Grangeasse, C., & Morlot, C. (2018). *The cell wall hydrolase Pmp23 is important for assembly and stability of the division ring in Streptococcus pneumoniae*. In *Scientific Report*, 8(1):7591. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25882-y>
- Jameson, K. H., & Wilkinson, A. J. (2017). *Control of Initiation of DNA Replication in Bacillus subtilis and Escherichia coli*. In *Genes*, 8(1):22. <https://doi.org/10.3390/genes8010022>
- Janczarek, M., Vinardell, J.-M., Lipa, P., & Kara's, M. K. (2018). *Molecular Sciences Hanks-Type Serine/Threonine Protein Kinases and Phosphatases in Bacteria: Roles in Signaling and Adaptation to Various Environments*. In *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10):2872. <https://doi.org/10.3390/ijms19102872>
- Johnsborg, O., & Håvarstein, L. S. (2009a). Pneumococcal LytR, a protein from the LytR-CpsA-Psr family, is essential for normal septum formation in Streptococcus pneumoniae. *Journal of Bacteriology*, 191(18), 5859–5864. <https://doi.org/10.1128/JB.00724-09>

- Johnsborg, O., & Håvarstein, L. S. (2009b). Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(3), 627–642. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00167.x>
- Johnston, C., Campo, N., Bergé, M. J., Polard, P., & Claverys, J.-P. (2014). *Streptococcus pneumoniae*, le transformiste. *Trends in Microbiology*, 22, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.002>
- Johnston, C. H., Soulet, A.-L., Bergé, M., Prudhomme, M., de Lemos, D., & Polard, P. (2020). The alternative sigma factor  $\sigma^X$  mediates competence shut-off at the cell pole in *Streptococcus pneumoniae*. In *Elife*, 9:e62907. <https://doi.org/10.7554/eLife.62907>
- Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C., & Andrew, P. W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. In *Nature Review. Microbiology*, 6(4):299-301. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1871>
- Karst, J. C., Foucher, A. E., Campbell, T. L., di Guilmi, A. M., Stroebel, D., Mangat, C. S., Brown, E. D., & Jault, J. M. (2009). The ATPase activity of an “essential” *Bacillus subtilis* enzyme, YdiB, is required for its cellular function and is modulated by oligomerization. *Microbiology*, 155(3), 944–956. <https://doi.org/10.1099/mic.0.021543-0>
- Kauffmann, F., Lund, E., & Eddy, B. E. (1960). Proposal for a Change in the Nomenclature of Diplococcus Pneumoniae and a Comparison of the Danish and American Type Designations. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*, 10(1), 31–40. <https://doi.org/10.1099/0096266x-10-1-31>
- Kell, C. M., Sharma, U. K., Dowson, C. G., Town, C., Balganes, T. S., & Spratt, B. G. (1993). Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 106). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb05954.x>
- Kennelly, P. J. (2002). Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 206(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb10978.x>
- Kharat, A. S., & Tomasz, A. (2003). Inactivation of the *srtA* Gene Affects Localization of Surface Proteins and Decreases Adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to Human Pharyngeal Cells In Vitro. *Infection and Immunity*, 71(5), 2758–2765. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2758-2765.2003>
- Kiekebusch, D., & Thanbichler, M. (2014). Spatiotemporal organization of microbial cells by protein concentration gradients. *Trends in Microbiology*, 22, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.005>
- Kietzman, C. C., Gao, G., Mann, B., Myers, L., & Tuomanen, E. I. (2016). ARTICLE Dynamic capsule restructuring by the main pneumococcal autolysin LytA in response to the epithelium. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms10859>
- Kirstein, J., & Turgay, K. (2006). A new tyrosine phosphorylation mechanism involved in signal transduction in *Bacillus subtilis*. In *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* (Vol. 9, Issues 3–4, pp. 182–188). J Mol Microbiol Biotechnol. <https://doi.org/10.1159/000089646>
- Kislak, J. W., Razavi, L. M., Daly, A. K., & Finland, M. (1965). Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *The American Journal of the Medical Sciences*, 250(3), 261–268. <https://doi.org/10.1097/00000441-196509000-00003>

- Kjos, M., & Veening, J.-W. (2014). Tracking of chromosome dynamics in live *Streptococcus pneumoniae* reveals that transcription promotes chromosome segregation. *Molecular Microbiology*, *91*(6), 1088–1105. <https://doi.org/10.1111/mmi.12517>
- Klotz, M. G., Grangeasse, C., Harwood, C., Jensen, P. R., Mijakovic, I., Derouiche, A., Shi, L., & Kalantari, A. (2016). *Substrate Specificity of the Bacillus subtilis BY-Kinase PtkA Is Controlled by Alternative Activators: TkmA and Sala*. In *Frontiers in Microbiology*, *7*:1525. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01525>
- Kobir, A., Shi, L., Boskovic, A., Grangeasse, C., Franjevic, D., & Mijakovic, I. (2011). Protein phosphorylation in bacterial signal transduction. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1810, Issue 10, pp. 989–994). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.01.006>
- Kovács, M., Halfmann, A., Fedtke, I., Heintz, M., Peschel, A., Vollmer, W., Hakenbeck, R., & Brückner, R. (2006). A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of D-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, *188*(16), 5797–5805. <https://doi.org/10.1128/JB.00336-06>
- Kravanja, M., Engelmann, R., Dossonnet, V., Bluggel, M., Meyer, H. E., Frank, R., Galinier, A., Deutscher, J., Schnell, N., & Hengstenberg, W. (1999). The *hprK* gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Molecular Microbiology*, *31*(1), 59–66. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01146.x>
- Kuru, E., Velocity Hughes, H., Brown, P. J., Hall, E., Tekkam, S., Cava, F., de Pedro, M. A., Brun, Y. v., & VanNieuwenhze, M. S. (2012). In situ Probing of Newly Synthesized Peptidoglycan in Live Bacteria with Fluorescent D-Amino Acids. \*\* NIH Public Access. *Angew Chem Int Ed Engl*, *51*(50), 12519–12523. <https://doi.org/10.1002/anie.201206749>
- Lacour, S., Bechet, E., Cozzone, A. J., Mijakovic, I., & Grangeasse, C. (2008). *Tyrosine Phosphorylation of the UDP-Glucose Dehydrogenase of Escherichia coli Is at the Crossroads of Colanic Acid Synthesis and Polymyxin Resistance*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003053>
- Lam, T., Ellison, C. K., Eddington, D. T., Brun, Y. v., Dalia, A. B., & Morrison, D. A. (2021). Competence pili in *Streptococcus pneumoniae* are highly dynamic structures that retract to promote DNA uptake. *Molecular Microbiology*, *mmi.14718*. <https://doi.org/10.1111/mmi.14718>
- Land, A. D., Tsui, H. C. T., Kocaoglu, O., Vella, S. A., Shaw, S. L., Keen, S. K., Sham, L. T., Carlson, E. E., & Winkler, M. E. (2013). Requirement of essential Pbp2x and GpsB for septal ring closure in *Streptococcus pneumoniae*D39. *Molecular Microbiology*, *90*(5), 939–955. <https://doi.org/10.1111/mmi.12408>
- Land, A. D., & Winkler, M. E. (2011). The requirement for pneumococcal MreC and MreD is relieved by inactivation of the gene encoding PBP1a. *Journal of Bacteriology*, *193*(16), 4166–4179. <https://doi.org/10.1128/JB.05245-11>
- Lara, B., Rico, A. I., 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. *Molecular Microbiology*, *55*(3), 699–711. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04432.x>
- Larson, T. R., & Yother, J. (2017). *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide is linked to peptidoglycan via a direct glycosidic bond to  $\beta$ -D-N-acetylglucosamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(22), 5695–5700. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620431114>

- Lauhon, C. T. (2012). Mechanism of N6-threonylcarbamoyladenonsine (t6A) biosynthesis: Isolation and characterization of the intermediate threonylcarbamoyl-AMP. *Biochemistry*, *51*(44), 8950–8963. <https://doi.org/10.1021/bi301233d>
- Laurenceau, R., Péhau-Arnaudet, G., Baconnais, S., Gault, J., Malosse, C., Dujeancourt, A., Campo, N., Chamot-Rooke, J., le Cam, E., Claverys, J.-P., & Fronzes, R. (2013). A Type IV Pilus Mediates DNA Binding during Natural Transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathogens*, *9*(6), e1003473. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003473>
- Laurenceau, R., Krasteva, P. v., Diallo, A., Ouarti, S., Duchateau, M., Malosse, C., Chamot-Rooke, J., & Fronzes, R. (2015). Conserved *Streptococcus pneumoniae* Spirosomes Suggest a Single Type of Transformation Pilus in Competence. *PLoS Pathogens*, *11*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004835>
- Le, T. B. K., & Jalal, A. S. B. (2020). *Bacterial chromosome segregation by the ParABS system*. In *Open Biology*, *10*(6):2000097. <https://doi.org/10.1098/rsob.200097>
- Leipe, D. D., Koonin, E. v., & Aravind, L. (2003). Evolution and Classification of P-loop Kinases and Related Proteins. *J. Mol. Biol*, *333*, 781–815. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.08.040>
- Levin, P. A., Kurtser, I. G., & Grossman, A. D. (1999). Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. In *Cell Biology* (Vol. 96). [www.pnas.org](http://www.pnas.org).
- Li, Q., Cheng, W., Morlot, C., Bai, X. H., Jiang, Y. L., Wang, W., Roper, D. I., Vernet, T., Dong, Y. H., Chen, Y., & Zhou, C. Z. (2015). Full-length structure of the major autolysin LytA. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *71*(Pt 6), 1373–1381. <https://doi.org/10.1107/S1399004715007403>
- Liu, Y., Zeng, Y., Huang, Y., Gu, L., Wang, S., Li, C., Morrison, D. A., Deng, H., & Zhang, J. R. (2019). HtrA-mediated selective degradation of DNA uptake apparatus accelerates termination of pneumococcal transformation. *Molecular Microbiology*, *112*(4), 1308–1325. <https://doi.org/10.1111/mmi.14364>
- Luthra, A., Swinehart, W., Bayooz, S., Phan, P., Stec, B., Iwata-Reuyl, D., & Swairjo, M. A. (2018). Structure and mechanism of a bacterial t6A biosynthesis system. *Nucleic Acids Research*, *46*(3), 1395–1411. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1300>
- Macek, B., Forchhammer, K., Hardouin, J., Weber-Ban, E., Grangeasse, C., & Mijakovic, I. (2019). Protein post-translational modifications in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0243-0>
- Macleod, C. M., Hodges, R. G., Heidelberger, M., & Bernhard, W. G. (1945). Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *Journal of Experimental Medicine*, *82*(6), 445–465. <https://doi.org/10.1084/jem.82.6.445>
- Mäkelä, P. H., & Butler, J. C. (2014). History of Pneumococcal Immunization. In *Pneumococcal Vaccines* (pp. 19–29). American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555815820.ch2>
- Mangat, C. S., & Brown, E. D. (2008). Known Bioactive Small Molecules Probe the Function of a Widely Conserved but Enigmatic Bacterial ATPase, YjeE. *Chemistry and Biology*, *15*(12), 1287–1295. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.10.007>
- Manuse, S., Fleurie, A., Zucchini, L., Lesterlin, C., & Grangeasse, C. (2015). Role of eukaryotic-like serine/threonine kinases in bacterial cell division and morphogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*, *40*(1), 41–56. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv041>

- Manuse, S., Jean, N. L., Guinot, M., Lavergne, J.-P., Laguri, C., Bougault, C. M., Vannieuwenhze, M. S., Grangeasse, C., & Simorre, J.-P. (2016). ARTICLE Structure-function analysis of the extracellular domain of the pneumococcal cell division site positioning protein MapZ. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms12071>
- Marie, L., Rapisarda, C., Morales, V., Bergé, M., Perry, T., Soulet, A. L., Gruget, C., Remaut, H., Fronzes, R., & Polard, P. (2017). Bacterial RadA is a DnaB-Type helicase interacting with RecA to promote bidirectional D-loop extension. *Nature Communications*, *8*. <https://doi.org/10.1038/ncomms15638>
- Martner, A., Dahlgren, C., Paton, J. C., & Wold, A. E. (2008). Pneumolysin Released during *Streptococcus pneumoniae* Autolysis Is a Potent Activator of Intracellular Oxygen Radical Production in Neutrophils. *Infection and Immunity*, *76*(9), 4079–4087. <https://doi.org/10.1128/IAI.01747-07>
- Mascher, T., Helmann, J. D., & Uden, G. (2006). Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *70*(4), 910–938. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-06>
- Massidda, O., Nováková, L., & Vollmer, W. (2013). From models to pathogens: how much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division? *Environmental Microbiology*, *15*(12), 3133–3157. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12189>
- Mateos-Gil, P., Tarazona, P., & Elez, M. v. (2019). Bacterial cell division: modeling FtsZ assembly and force generation from single filament experimental data. *FEMS Microbiology Reviews*, *039*, 73–87. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy039>
- Meeske, A. J., Riley, E. P., Robins, W. P., Uehara, T., Mekalanos, J. J., Kahne, D., Walker, S., Kruse, A. C., Bernhardt, T. G., & Rudner, D. Z. (2016). SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases HHS Public Access. *Nature*, *537*(7622), 634–638. <https://doi.org/10.1038/nature19331>
- Mellroth, P., Daniels, R., Eberhardt, A., Rönnlund, D., Blom, H., Widengren, J., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2012). LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(14), 11018–11029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318584>
- Mercy, C., Ducret, A., Slager, J., Lavergne, J. P., Freton, C., Nagarajan, S. N., Garcia, P. S., Noirot-Gros, M. F., Dubarry, N., Nourikyan, J., Veening, J. W., & Grangeasse, C. (2019). RocS drives chromosome segregation and nucleoid protection in *Streptococcus pneumoniae*. In *Nature Microbiology* (Vol. 4, Issue 10, pp. 1661–1670). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0472-z>
- Mijakovic, I., Grangeasse, C., & Urs, adurs, ad Turgay, K. “. (2016). Exploring the diversity of protein modifications: special bacterial phosphorylation systems. *FEMS Microbiology Reviews*, *003*, 398–417. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw003>
- Mijakovic, I., & Macek, B. (2012). Impact of phosphoproteomics on studies of bacterial physiology. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(4), 877–892. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00314.x>
- Mijakovic, I., Musumeci, L., Lutz Tautz, †, Petranovic, D., Edwards, R. A., Jensen, P. R., Mustelin, T., Deutscher, J., & Bottini, N. (2005). In Vitro Characterization of the *Bacillus subtilis* Protein Tyrosine Phosphatase YwqE. *Journal of Bacteriology*, *187*(10), 3384–3390. <https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3384-3390.2005>



- Mijakovic, I., Petranovic, D., Macek, B., Cepo, T., Mann, M., Davies, J., Jensen, P. R., & Vujaklija, D. (2006). *Bacterial single-stranded DNA-binding proteins are phosphorylated on tyrosine*. In *Nucleic Acids research*, 34(5):1588-96. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj514>
- Mijakovic, I., Poncet, S., Galinier, A., Monedero, V., Fieulaine, S., Janin, J., Nessler, S., Antonio Marquez, J., Scheffzek, K., Hasenbein, S., Hengstenberg, W., & Deutscher, J. (2002). *Pyrophosphate-producing protein dephosphorylation by HPr kinasephosphorylase: A relic of early life?* In *PNAS*, 99(21):13442-7. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.212410399](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.212410399)
- Miller, M., Donat, S., Raketle, S., Stehle, T., Kouwen, T. R. H. M., Diks, S. H., Dreisbach, A., Reilman, E., Gronau, K., Rte Becher, D., Peppelenbosch, M. P., Maarten Van Dijk, J., & Ohlsen, K. (2010). *Staphylococcal PknB as the First Prokaryotic Representative of the Proline-Directed Kinases*. In *PloS One*, 5(2):e9057. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009057>
- Minnen, A., Attaiech, L., Thon, M., Gruber, S., & Veening, J.-W. (2011). SMC is recruited to oriC by ParB and promotes chromosome segregation in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 81(3), 676–688. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07722.x>
- Mir, M., Asong, J., Li, X., Cardot, J., & Boons, G.-J. (2011). The Extracytoplasmic Domain of the *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr Kinase PknB Binds Specific Muropeptides and Is Required for PknB Localization. *PLoS Pathog*, 7(7), 1002182. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002182>
- Mirouze, N., Bergé, M. A., Soulet, A.-L., Mortier-Barrière, I., Quentin, Y., Fichant, G., Granadel, C., Noirot-Gros, M.-F., Noirot, P., Polard, P., Martin, B., & Claverys, J.-P. (2013). *Direct involvement of DprA, the transformation-dedicated RecA loader, in the shut-off of pneumococcal competence*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219868110>
- Moore, HF. Chesney, AM. (1917). A study of ethylhydrocupreine (optochin) in the treatment of acute lobar pneumonia. In *Arch Intern Med* (19th ed., pp. 611–682).
- Moreillon, P., Wenger, A., & Caldelari, I. (2000). [Pneumococcal antibiotic resistance]. *Revue Medicale de La Suisse Romande*, 120(8), 651–659. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11028185>
- Morlot, C., Bayle, L., Jacq, M., Fleurie, A., Tourcier, G., Galisson, F., Vernet, T., Grangeasse, C., & 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. *Molecular Microbiology*, 90(1), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/mmi.12348>
- Morlot, Cécile, Noirclerc-Savoie, M., Zapun, A., Dideberg, O., & Vernet, T. (2004). The d,d-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 51(6), 1641–1648. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03953.x>
- Morlot, Cécile, Straume, D., Peters, K., Hegnar, O. A., Simon, N., Villard, A. M., Contreras-Martel, C., Leisico, F., Breukink, E., Gravier-Pelletier, C., le Corre, L., Vollmer, W., Pietrancosta, N., Håvarstein, L. S., & Zapun, A. (2018). Structure of the essential peptidoglycan amidotransferase MurT/GatD complex from *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05602-w>
- Morlot, Cécile, 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. *Molecular Microbiology*, 50(3), 845–855. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14617146>

- Morona, J. K., Morona, R., Miller, D. C., & Paton, J. C. (2002). Streptococcus pneumoniae Capsule Biosynthesis Protein CpsB Is a Novel Manganese-Dependent Phosphotyrosine-Protein Phosphatase. *Journal of Bacteriology*, 184(2), 577–583. <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.577-583.2002>
- Mortier-Barrière, I., Velten, M., Dupaigne, P., Mirouze, N., Piétrement, O., McGovern, S., Fichant, G., Martin, B., Noirot, P., le Cam, E., Polard, P., & Claverys, J. P. (2007). A Key Presynaptic Role in Transformation for a Widespread Bacterial Protein: DprA Conveys Incoming ssDNA to RecA. *Cell*, 130(5), 824–836. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.038>
- Moyes, R. B., Reynolds, J., & Breakwell, D. P. (2009). Differential staining of bacteria: Gram stain. In *Current Protocols in Microbiology: Vol. Appendix 3* (Issue SUPPL. 15, p. Appendix 3C). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs15>
- Muaoz-Dorado, J., Inouye, S., & Lnouye, M. (1991). A Gene Encoding a Protein Serine/Threonine Kinase Is Required for Normal Development of *M. xanthus*, a Gram-Negative Bacterium. In *Cell* (Vol. 67).
- Mukamolova, G. v, Turapov, O., Loraine, J., Jenkins, C. H., Barthe, P., Mcfeely, D., Forti, F., Ghisotti, D., Heseck, D., Lee, M., Bottrill, A. R., Vollmer, W., Mobashery, S., & Cohen-Gonsaud, M. (2015). The external PASTA domain of the essential serine/threonine protein kinase PknB regulates mycobacterial growth. In *Open Biology*, 5(7):150025. <https://doi.org/10.1098/rsob.150025>
- Mura, A., Fadda, D., Perez, A. J., Danforth, M. L., Musu, D., Rico, A. I., Krupka, M., Denapaita, D., Tsui, H. C. T., Winkler, M. E., Branny, P., Vicente, M., Margolin, W., & Massidda, O. (2017). Roles of the essential protein FtsA in cell growth and division in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 199(3). <https://doi.org/10.1128/JB.00608-16>
- Muschiol, S., Balaban, M., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2015). Prospects & Overviews Uptake of extracellular DNA: Competence induced pili in natural transformation of *Streptococcus pneumoniae*. In *Bioessays*, 37(4):426-35. <https://doi.org/10.1002/bies.201400125>
- Nguyen, H. A., el Khoury, T., Guiral, S., Laaberki, M. H., Candusso, M. P., Galisson, F., Foucher, A. E., Kesraoui, S., Ballut, L., Vallet, S., Orelle, C., Zucchini, L., Martin, J., Page, A., Attieh, J., Aghajari, N., Grangeasse, C., & Jault, J. M. (2017). Expanding the Kinome World: A New Protein Kinase Family Widely Conserved in Bacteria. *Journal of Molecular Biology*, 429(20), 3056–3074. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.08.016>
- Nguyen, H.-A. (2012). *Découverte d'une nouvelle famille de protéine kinases bactériennes : mécanismes de fonctionnement et rôle cellulaire de YdiB, un archétype chez Bacillus subtilis.*
- Nimmo, G. A., & Nimmo, H. G. (1984). The regulatory properties of isocitrate dehydrogenase kinase and isocitrate dehydrogenase phosphatase from *Escherichia coli* ML308 and the roles of these activities in the control of isocitrate dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, 141(2), 409–414. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08206.x>
- Noens, E. E., Mersinias, V., Willemse, J., Traag, B. A., Laing, E., Chater, K. F., Smith, C. P., Koerten, H. K., & van Wezel, G. P. (2007). Loss of the controlled localization of growth stage-specific cell-wall synthesis pleiotropically affects developmental gene expression in an *ssgA* mutant of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 64(5), 1244–1259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05732.x>
- Nourikyan, J., Kjos, M., Mercy, C., Cluzel, C., Morlot, C., Noirot-Gros, M.-F., Guiral, S., Lavergne, J.-P., Veening, J.-W., & Grangeasse, C. (2015). Autophosphorylation of the Bacterial Tyrosine-Kinase CpsD Connects Capsule Synthesis with the Cell Cycle in *Streptococcus pneumoniae*. In *PLoS Genetics*, (9):e1005518. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005518>

- Nováková, L., Sasková, L., Pallová, P., Janeček, J., Novotná, J., Ulrych, A., Echenique, J., Trombe, M.-C., & Branny, P. (2005). Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. *FEBS Journal*, 272(5), 1243–1254. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04560.x>
- Obadia, B., Lacour, S., Doublet, P., Baubichon-Cortay, H., Cozzone, A. J., & Grangeasse\*, C. (2006). *Influence of Tyrosine-Kinase Wzc Activity on Colanic Acid Production in Escherichia coli K12 Cells*. In *Journal of Molecular Biology*, 367(1):42-53. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.048>
- Olivares-Illana, V., Meyer, P., Bechet, E., Gueguen-Chaignon, V., Soulat, D., Lazereg-Riquier, S., Mijakovic, I., Deutscher, J., Cozzone, A. J., Lapré vote, O., Morera, S., Grangeasse, C., & Nessler, S. (2008). *Structural Basis for the Regulation Mechanism of the Tyrosine Kinase CapB from Staphylococcus aureus*. In *PLoS Biology*, 6(6):e143. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060143>
- Olsen, J. v, & Mann, M. (2013). *Status of Large-scale Analysis of Post-translational Modifications by Mass Spectrometry*. In *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(12):3444-52. <https://doi.org/10.1074/mcp.O113.034181>
- Paik, J., Kern, I., Lurz, † Rudi, & Hakenbeck, R. (1999). Mutational Analysis of the *Streptococcus pneumoniae* Bimodular Class A Penicillin-Binding Proteins. In *Journal of Bacteriology* (Vol. 181, Issue 12).
- Pasteur, L. (1881). Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. In *Bulletin de l'Académie nationale de médecine, Série 2* (pp. 94–103).
- Paton, J. C., Andrew, P. W., Boulnois, G. J., & Timothy Mitchell, K. J. (1993). MOLECULAR ANALYSIS OF THE PATHOGENICITY OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*: The Role of Pneumococcal Proteins. In *Annual Rev. Microbiol* (Vol. 47). [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
- Patterson, H., Nibbs, R., McInnes, I., & Siebert, S. (2014). Protein kinase inhibitors in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. In *Clinical and Experimental Immunology* (Vol. 176, Issue 1, pp. 1–10). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/cei.12248>
- Pawson, T., & Scott, J. D. (2005). Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(6), 286–290. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.04.013>
- Pearlman, S. M., Serber, Z., & Ferrell, J. E. (2011). A mechanism for the evolution of phosphorylation sites. *Cell*, 147(4), 934–946. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.052>
- Pelletier, A., Freton, C., Gallay, C., Trouve, J., Cluzel, C., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Jault, J.-M., Grangeasse, C., & Guiral, S. (2019). The Tyrosine-Autokinase UbK Is Required for Proper Cell Growth and Cell Morphology of *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 10(September), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01942>
- Pereira, S. F. F., Goss, L., & Dworkin, J. (2011). Eukaryote-Like Serine/Threonine Kinases and Phosphatases in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 192–212. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00042-10>
- Perez, A. J., Boersma, M. J., Bruce, K. E., Lamanna, M. M., Shaw, S. L., Tsui, H. C. T., Taguchi, A., Carlson, E. E., VanNieuwenhze, M. S., & Winkler, M. E. (2020). Organization of peptidoglycan synthesis in nodes and separate rings at different stages of cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/mmi.14659>

- Perez, A. J., Cesbron, Y., Shaw, S. L., Villicana, J. B., Tsui, H.-C. T., Boersma, M. J., Ye, Z. A., Tovpeko, Y., Dekker, C., Holden, S., & Winkler, M. E. (2019). *Movement dynamics of divisome proteins and PBP2x: FtsW in cells of Streptococcus pneumoniae*. In *PNAS*, 116(8), 3211–3220. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816018116>
- Pestova, E. v., Håvarstein, L. S., & 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. *Molecular Microbiology*, 21(4), 853–862. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.501417.x>
- Peterson, S. N., Sung, C. K., Cline, R., Desai, B. v., Snesrud, E. C., Luo, P., Walling, J., Li, H., Mintz, M., Tsegaye, G., Burr, P. C., Do, Y., Ahn, S., Gilbert, J., Fleischmann, R. D., & Morrison, D. A. (2004). Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Molecular Microbiology*, 51(4), 1051–1070. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03907.x>
- Philippe, J., Vernet, T., & Zapun, A. (2014). *The Elongation of Ovococci*. In *Microbial Drug Resistance*, 20(3):213-21. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0032>
- Pickl, A., Johnsen, U., & Schönheit, P. (2012). *Fructose Degradation in the Haloarchaeon Haloferax volcanii Involves a Bacterial Type Phosphoenolpyruvate-Dependent Phosphotransferase System, Fructose-1-Phosphate Kinase, and Class II Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase*. In *Journal of Bacteriology*, 194(12):3088-97. <https://doi.org/10.1128/JB.00200-12>
- Pilishvili, T., Lexau, C., Farley, M. M., Hadler, J., Harrison, L. H., Bennett, N. M., Reingold, A., Thomas, A., Schaffner, W., Craig, A. S., Smith, P. J., Beall, B. W., Whitney, C. G., Moore, M. R., & Network, P. (2010). *Sustained Reductions in Invasive Pneumococcal Disease in the Era of Conjugate Vaccine for the Active Bacterial Core Surveillance/Emerging Infections*. In *The Journal of Infectious Diseases*, 201(1):32-41. 201. <https://doi.org/10.1086/648593>
- Piñas, G. E., Reinoso-Vizcaino, N. M., Yandar Barahona, N. Y., Cortes, P. R., Duran, R., Badapanda, C., Rathore, A., Bichara, D. R., Cian, M. B., Olivero, N. B., Perez, D. R., & Echenique, J. (2018). *Crosstalk between the serine/threonine kinase StkP and the response regulator ComE controls the stress response and intracellular survival of Streptococcus pneumoniae*. In *PloS Pathogens*, 14(6):e1007118. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007118>
- Pinho, M. G., Kjos, M., & Veening, J.-W. (2013). How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nature Publishing Group*, 11. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3088>
- Piotrowski, A., Luo, P., & Morrison, D. A. (2009). Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: Termination of activity of the alternative sigma factor ComX is independent of proteolysis of ComX and ComW. *Journal of Bacteriology*, 191(10), 3359–3366. <https://doi.org/10.1128/JB.01750-08>
- Pompeo, F., Freton, C., Wicker-Planquart, C., Grangeasse, C., Jault, J. M., & Galinier, A. (2012). Phosphorylation of CpgA protein enhances both its GTPase activity and its affinity for ribosome and is crucial for *Bacillus subtilis* growth and morphology. *Journal of Biological Chemistry*, 287(25), 20830–20838. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.340331>
- Poolman, J. T., Peeters, C. C., & van den Dobbelsteen, G. P. (2013). The history of pneumococcal conjugate vaccine development: Dose selection. In *Expert Review of Vaccines* (Vol. 12, Issue 12, pp. 1379–1394). <https://doi.org/10.1586/14760584.2013.852475>

- Popoola, B. (1972). Pneumococci Producing Beta Hemolysis on Agar. In *Applied Microbiology*, 24(1):44-7.
- Postma, P. W., Lengeler, J. W., Jacobson, G. R., & Slater, E. C. (1993). Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria. In *Microbiological Reviews* (Vol. 57, Issue 3).
- Price, K. E., Greene, N. G., & Camilli, A. (2012). Export Requirements of Pneumolysin in *Streptococcus pneumoniae*. In *Journal of Bacteriology*, 194(14):3651-60. <https://doi.org/10.1128/JB.00114-12>
- Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., & Claverys, J. (2006). Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. In *Science*, 313(5783):89-92. <https://doi.org/10.1029/2002TC001374>
- Quevillon-Cheruel, S., Campo, N., Mirouze, N., Mortier-Barrière, I., Brooks, M. A., Boudes, M., Durand, D., Soulet, A. L., Lisboa, J., Noiro, P., Martin, B., van Tilbeurgh, H., Noiro-Gros, M. F., Claverys, J. P., & Polard, P. (2012). Structure-function analysis of pneumococcal DprA protein reveals that dimerization is crucial for loading RecA recombinase onto DNA during transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(37), E2466. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205638109>
- Rajagopal, M., & Walker, S. (2017). Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol*. [https://doi.org/10.1007/82\\_2015\\_5021](https://doi.org/10.1007/82_2015_5021)
- Rico-Lastres, P., Díez-Martínez, R., Iglesias-Bexiga, M., Bustamante, N., Aldridge, C., Heseck, D., Lee, M., Mobashery, S., Gray, J., Vollmer, W., García, P., & Menéndez, M. (2015). Substrate recognition and catalysis by LytB, a pneumococcal peptidoglycan hydrolase involved in virulence OPEN. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/srep16198>
- Robbins, J. B., Austrian, R., Lee, C.-A., Rastogi, S. C., Schiffman, G., Henrichsen, J., Makela, H, Broome, C. v, Facklam, R. R., Tiesjema, R. H., & Parke, J. C. (1983). Considerations for Formulating the Second-Generation Pneumococcal Capsular Polysaccharide Vaccine with Emphasis on the Cross-Reactive Types Within Groups. In *THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES* • (Vol. 148, Issue 6). <https://academic.oup.com/jid/article-abstract/148/6/1136/854160>
- Rogers, H. J., Perkins, H. R., & Ward, J. B. (1980). Microbial Cell Walls and Membranes. In *Microbial Cell Walls and Membranes*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-6014-8>
- Ronson, C. W., Nixon, T., & Ausubel, F. M. (1987). Conserved Domains in Bacterial Regulatory Proteins That Respond to Environmental Stimuli Minireview. In *Cell* (Vol. 49).
- Roumestand, C., Leiba, J., Galoppe, N., Margeat, E., Padilla, A., Bessin, Y., Barthe, P., Molle, V., & Cohen-Gonsaud, M. (2011). Article Structural Insight into the Mycobacterium tuberculosis Rv0020c Protein and Its Interaction with the PknB Kinase. *Structure/Folding and Design*, 19, 1525–1534. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.07.011>
- Rowlett, V. W., & Margolin, W. (2015). The Min system and other nucleoid-independent regulators of Z ring positioning. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00478>
- Rubins, J. B., & Janoff, E. N. (1998). Pneumolysin: A multifunctional pneumococcal virulence factor. In *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* (Vol. 131, Issue 1, pp. 21–27). Mosby Inc. [https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(98\)90073-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2143(98)90073-7)
- Salvadori, G., Junges, R., Morrison, D. A., & Petersen, F. C. (2019). Competence in streptococcus pneumoniae and close commensal relatives: Mechanisms and implications. In *Frontiers in Cellular*

*and Infection Microbiology* (Vol. 9, Issue APR). Frontiers Media S.A.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00094>

- Sanchez-Puelles, J. M., RONDA, C., GARCIA, J. L., GARCIA, P., LOPEZ, R., & GARCIA, E. (1986). Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *European Journal of Biochemistry*, *158*(2), 289–293. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09749.x>
- Sasková, L., Nováková, L., Basler, M., & Branny, P. (2007). Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, *189*(11), 4168–4179. <https://doi.org/10.1128/JB.01616-06>
- Schumacher, D., Bergeler, S., Harms, A., Vonck, J., Huneke-Vogt, S., Frey, E., & Søggaard-Andersen, L. (2017). The PomXYZ Proteins Self-Organize on the Bacterial Nucleoid to Stimulate Cell Division. *Developmental Cell*, *41*(3), 299–314.e13. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.04.011>
- Schumacher, D., Harms, A., Bergeler, S., Frey, E., & Sogaard-Andersen, L. (2021). PomX, a ParA/MinD ATPase activating protein, is a triple regulator of cell division in *Myxococcus xanthus*. *ELife*, *10*. <https://doi.org/10.7554/elife.66160>
- Shah, I. M., Laaberki, M.-H., Popham, D. L., & Dworkin, J. (2008). A Eukaryotic-like Ser/Thr Kinase Signals Bacteria to Exit Dormancy in Response to Peptidoglycan Fragments. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.039>
- Sham, L.-T., Butler, E. K., Lebar, M. D., Kahne, D., Bernhardt, T. G., & Ruiz, N. (2014). MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science*, *345*(6193), 220–222. <https://doi.org/10.1126/science.1254522>
- Sham, L.-T., Tsui, H.-C. T., Land, A. D., Barendt, S. M., & Winkler, M. E. (2012). Recent Advances in Pneumococcal Peptidoglycan Biosynthesis Suggest New Vaccine and Antimicrobial Targets. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.12.013>
- Shi, L., Pigeonneau, N., Ventroux, M., Derouiche, A., Bidnenko, V., Mijakovic, I., & Noirot-Gros, M.-F. (2014). Protein-tyrosine phosphorylation interaction network in *Bacillus subtilis* reveals new substrates, kinase activators and kinase cross-talk. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00538>
- Singh, J. K., Makde, R. D., Kumar, V., & Panda, D. (2007). A Membrane Protein, *EzrA*, Regulates Assembly Dynamics of FtsZ by Interacting with the C-Terminal Tail of FtsZ. In *Biochemistry*, *46*(38):11013–22. <https://doi.org/10.1021/bi700710j>
- Singh, J. K., Makde, R. D., Kumar, V., & Panda, D. (2008). *SepF* Increases the Assembly and Bundling of FtsZ Polymers and Stabilizes FtsZ Protofilaments by Binding along Its Length. In *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(45):31116–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805910200>
- Sogues, A., Martinez, M., Gaday, Q., ben Assaya, M., Graña, M., Voegele, A., VanNieuwenhze, M., England, P., Haouz, A., Chenal, A., Trépout, S., Duran, R., Wehenkel, A. M., & Alzari, P. M. (2020). Essential dynamic interdependence of FtsZ and SepF for Z-ring and septum formation in *Corynebacterium glutamicum*. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15490-8>
- Spirig, T., Weiner, E. M., & Clubb, R. T. (2011). Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. In *Molecular Microbiology*, *82*(5):1044–59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07887.x>
- Stamsås, G. A., Myrbråten, I. S., Straume, D., Salehian, Z., Veening, J. W., Håvarstein, L. S., & Kjos, M. (2018). CozEa and CozEb play overlapping and essential roles in controlling cell division in

- Staphylococcus aureus. *Molecular Microbiology*, 109(5), 615–632.  
<https://doi.org/10.1111/mmi.13999>
- Stamsås, G. A., Restelli, M., Ducret, A., Freton, C., Garcia, P. S., Håvarstein, L. S., Straume, D., Grangeasse, C., & Kjos, M. (2020). A *CozE* Homolog Contributes to Cell Size Homeostasis of *Streptococcus pneumoniae*. In *mBio*, 11(5):e02461. <https://doi.org/10.1128/mBio.02461-20>
- Stamsås, G. A., Straume, D., Ruud Winther, A., Kjos, M., Frantzen, C. A., & Håvarstein, L. S. (2017). Identification of EloR (Spr1851) as a regulator of cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 105(6), 954–967. <https://doi.org/10.1111/mmi.13748>
- Stancik, I. A., Šestak, M. S., Ji, B., Axelson-Fisk, M., Franjevic, D., Jers, C., Domazet-Lošo, T., & Mijakovic, I. (2018). Serine/Threonine Protein Kinases from Bacteria, Archaea and Eukarya Share a Common Evolutionary Origin Deeply Rooted in the Tree of Life. *Journal of Molecular Biology*, 430(1), 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.11.004>
- Standish, A. J., & Morona, R. (2014). The Role of Bacterial Protein Tyrosine Phosphatases in the Regulation of the Biosynthesis of Secreted Polysaccharides. In *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(14):2274-89. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5726>
- Stefanović, C. S., Hager, F. F., & Schäffer, C. (2021). *Molecular Sciences LytR-CpsA-Psr Glycopolymer Transferases: Essential Bricks in Gram-Positive Bacterial Cell Wall Assembly*. In *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2):908. <https://doi.org/10.3390/ijms22020908>
- Sternberg, G. (1881). A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by subcutaneous injection of human saliva: an experimental research. In *Annual Reports of the National Board of Health* (pp. 87–108).
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 183–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>
- Straume, D., Anita Stamsås, G., & Sigve Håvarstein, L. (2014). Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. In *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 33:371-80. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.020>
- Straume, D., Piechowiak, K. W., Kjos, M., & Sigve Håvarstein, L. (2021). Class A PBPs: it is time to rethink traditional paradigms. *Molecular Microbiology*, mmi.14714. <https://doi.org/10.1111/mmi.14714>
- Straume, D., Wiaroslawa Piechowiak, K., Olsen, S., Anita Stamsås, G., Helene Berg, K., Kjos, M., Victoria Heggenhougen, M., Alcorlo, M., Hermoso, J. A., & Sigve Håvarstein, L. (2020). Class A PBPs have a distinct and unique role in the construction of the pneumococcal cell wall. <https://doi.org/10.1101/665463>
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Stülke, J., Pancholi, V., Gómez-Mejia, A., Hirschfeld, C., Bartel, J., Hentschker, C., Rohde, M., Maaß, S., Hammerschmidt, S., & Becher, D. (2020). Proteomic Investigation Uncovers Potential Targets and Target Sites of Pneumococcal Serine-Threonine Kinase *StkP* and Phosphatase *PhpP*. In *Frontiers of Microbiology*, 10:3101. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03101>

- Sun, X., Ge, F., Xiao, C. le, Yin, X. F., Ge, R., Zhang, L. H., & He, Q. Y. (2010). Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Proteome Research*, 9(1), 275–282. <https://doi.org/10.1021/pr900612v>
- Sung, C. K., Li, H., Claverys, J. P., & Morrison, D. A. (2001). An rpsL Cassette , Janus , for Gene Replacement through Negative Selection in *Streptococcus pneumoniae* An rpsL Cassette , Janus , for Gene Replacement through Negative Selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5190–5196. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5190>
- Sung, C. K., & Morrison, D. A. (2005). Two distinct functions of ComW in stabilization and activation of the alternative sigma factor ComX in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 187(9), 3052–3061. <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3052-3061.2005>
- Suskiewicz, M. J., Hajdusits, B., Beveridge, R., Heuck, A., Dai Vu, L., Kurzbauer, R., Hauer, K., Thoeny, V., Rumpel, K., Mechtler, K., Meinhart, A., & Clausen, T. (2019). Structure of McsB, a protein kinase for regulated arginine phosphorylation Europe PMC Funders Group. *Nat Chem Biol*, 15(5), 510–518. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0265-y>
- Tacconelli, E., Mendelson, M., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, L., Hansen, P., Singh, N., ... Magrini, N. (2017). *Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis*. In *The Lancet: Infectious Diseases*, 18(3):318-327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tchieu, J. H., Norris, V., Edwards, J. S., & Saier, J. (2001). The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(3), 329–346.
- Thiaville, P. C., Yacoubi, B. el, Köhrer, C., Thiaville, J. J., Deutsch, C., Iwata-Reuyl, D., Bacusmo, J. M., Armengaud, J., Bessho, Y., Wetzels, C., Cao, X., Limbach, P. A., Rajbhandary, U. L., & de Crécy-Lagard, V. (2015). Essentiality of threonylcarbamoyladenosine (t<sup>6</sup>A), a universal tRNA modification, in bacteria HHS Public Access. *Mol Microbiol*, 98(6), 1199–1221. <https://doi.org/10.1111/mmi.13209>
- Thomasson, B., Link, J., Stassinopoulos, A. G., Burke, N., Plamann, L., & Hartzell, P. L. (2002). MgLA, a small GTPase, interacts with a tyrosine kinase to control type IV pili-mediated motility and development of *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 46(5), 1399–1413. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03258.x>
- Thornton, J. A., Durick-Eder, K., & Tuomanen, E. I. (2010). Pneumococcal pathogenesis: “innate invasion” yet organ-specific damage. In *Journal of Molecular Medicine* (Vol. 88, Issue 2, pp. 103–107). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0578-5>
- Throup, J. P., Koretke, K. K., Bryant, A. P., Ingraham, K. A., Chalker, A. F., Yigong, G., Marra, A., Wallis, N. G., Brown, J. R., Holmes, D. J., Rosenberg, M., & Burnham, M. K. R. (2000). A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 35(3), 566–576. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01725.x>
- Tilley, S. J., & Orlova, E. v. (2005). Structural Basis of Pore Formation by the Bacterial Toxin Pneumolysin. *Cell*, 121, 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.033>
- Tocilj, A., Munger, C., Proteau, A., Morona, R., Purins, L., Ajamian, E., Wagner, J., Papadopoulos, M., van den Bosch, L., Rubinstein, J. L., Féthière, J., Matte, A., & Cygler, M. (2008). *Bacterial polysaccharide co-polymerases share a common framework for control of polymer length*. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1374>



- Tomasz, A. (1967). *Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in Pneumococcus*. In *Science*, 157(3789):694-7. <http://science.sciencemag.org/>
- Treuner-Lange, A., Aguiluz, K., van der Does, C., Gómez-Santos, N., Harms, A., Schumacher, D., Lenz, P., Hoppert, M., Kahnt, J., Muñoz-Dorado, J., & Sogaard-Andersen, L. (2013). PomZ, a ParA-like protein, regulates Z-ring formation and cell division in *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 87(2), 235–253. <https://doi.org/10.1111/mmi.12094>
- Trouve, J., Zapun, A., Arthaud, C., Durmort, C., di Guilmi, A. M., Söderström, B., Pelletier, A., Grangeasse, C., Bourgeois, D., Wong, Y.-S., & Morlot, C. (2021). Nanoscale dynamics of peptidoglycan assembly during the cell cycle of *Streptococcus pneumoniae*. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.041>
- Tsui, H. C. T., Zheng, J. J., Magallon, A. N., Ryan, J. D., Yunck, R., Rued, B. E., Bernhardt, T. G., & Winkler, M. E. (2016). Suppression of a deletion mutation in the gene encoding essential PBP2b reveals a new lytic transglycosylase involved in peripheral peptidoglycan synthesis in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Molecular Microbiology*, 100(6), 1039–1065. <https://doi.org/10.1111/mmi.13366>
- Ueda, A., & Wood, T. K. (2010). *Tyrosine Phosphatase TpbA of Pseudomonas aeruginosa Controls Extracellular DNA via Cyclic Diguanilic Acid Concentrations*. In *Environmental Microbiology*, 2(3):449-55. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00171.x>
- Ulijasz, A. T., Falk, S. P., & Weisblum, B. (2009). Phosphorylation of the RitR DNA-binding domain by a Ser-Thr phosphokinase: implications for global gene regulation in the streptococci. *Molecular Microbiology*, 71(2), 382–390. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06532.x>
- Ulrych, A., Holečková, N., Goldová, J., Doubravová, L., Benada, O., Kofroňová, O., Halada, P., & Branny, P. (2016). *Characterization of pneumococcal Ser/Thr protein phosphatase phpP mutant and identification of a novel PhpP substrate, putative RNA binding protein Jag*. In *BMC Microbiology*, 16(1):247. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0865-6>
- van Noort, V., Seebacher, J., Bader, S., Mohammed, S., Vonkova, I., Betts, M. J., Kü Hner, S., Kumar, R., Maier, T., O'flaherty, M., Rybin, V., Schmeisky, A., Yus, E., Rg, J., Lke, S., Serrano, L., Russell, R. B., Heck, A. J., & Gavin, A.-C. (2012). Cross-talk between phosphorylation and lysine acetylation in a genome-reduced bacterium. *Molecular Systems Biology*, 8, 571. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.4>
- Vigouroux, A., Cordier, B., Aristov, A., Oldewurtel, E., Özbaykal, G., Chaze, T., Matondo, M., Bikard, D., & van Teeffelen, S. (2019). Cell-wall synthases contribute to bacterial cell-envelope integrity by 2 actively repairing defects 3. *BioRxiv Preprint Doi: Https://Doi.Org/10.1101/763508*. <https://doi.org/10.1101/763508>
- Vincent, C., Duclos, B., Grangeasse, C., Vaganay, E., Ne Riberty, M. Á., Cozzone, A. J., & Doublet, P. (2000). Relationship Between Exopolysaccharide Production and Protein-tyrosine Phosphorylation in Gram-negative Bacteria Keywords: bacterial protein phosphorylation; protein-tyrosine kinase; phosphotyrosine-protein phosphatase; exopolysaccharide production. *J Mol Biol* . <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4217>
- Vollmer, W., Blanot, D., & de Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 149–167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
- Vollmer, W., Massidda, O., & Tomasz, A. (2019). *The Cell Wall of Streptococcus pneumoniae*. In *Microbiology Spectrum*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0018-2018>

- Vollmer, W., & Tomasz, A. (2000). The pgdA Gene Encodes for a Peptidoglycan N-Acetylglucosamine Deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20496–20501. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910189199>
- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., & Gatto, G. J. (2005). Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. In *Angewandte Chemie - International Edition* (Vol. 44, Issue 45, pp. 7342–7372). <https://doi.org/10.1002/anie.200501023>
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- Watson, D. A., Musher, D. M., Jacobson, J. W., & Verhoef, J. (1993). A Brief History of the Pneumococcus in Biomedical Research: A Panoply of Scientific Discovery Description of the Organism and Demonstration of Its Virulence. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 17). <https://academic.oup.com/cid/article/17/5/913/320611>
- Wehenkel, A., Bellinzoni, M., Graña, M., Duran, R., Villarino, A., Fernandez, P., Andre-Leroux, G., England, P., Takiff, H., Cerveñansky, C., Cole, S. T., & Alzari, P. M. (2007). *Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: Physiological roles and therapeutic potential*. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.08.006>
- Weinhä, K., Brennich, M., Kazmaier, U., Lelievre, J., Ballell, L., Goldberg, A., Schanda, P., & Fraga, H. (2018). The antibiotic cyclomarin blocks arginine-phosphate-induced millisecond dynamics in the N-terminal domain of ClpC1 from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem*, 22, 8379. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002251>
- Weiser, J. N., Austrian, R., Sreenivasan, P. K., & Robert, A. H. (1994). Phase Variation in Pneumococcal Opacity: Relationship between Colonial Morphology and Nasopharyngeal Colonization. In *Infection and Immunity* (Vol. 62, Issue 6).
- Weiser, J. N., Ferreira, D. M., & Paton, J. C. (2018). *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion HHS Public Access. *Nat Rev Microbiol*, 16(6), 355–367. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0001-8>
- Wells Rowlett, V., & Margolin, W. (2013). The bacterial Min system. In *CURBIO* (Vol. 23). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.024>
- Westheimer, F. H. (1987). *Why Nature Chose Phosphates*. In *Science*, 235(4793):1173-8. <http://science.sciencemag.org/>
- Whitfield, C. (2006). *Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in Escherichia coli*. In *Annual Reviews of Biochemistry*, 75:39-68. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142545>
- Whitfield, C., & Larue, K. (2008). *Stop and go: regulation of chain length in the biosynthesis of bacterial polysaccharides*. In *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(2):121-3. <http://www.nature.com/nsmb>
- Whittall, J. J., Morona, R., & Standish, A. J. (2015). *Topology of Streptococcus pneumoniae CpsC, a Polysaccharide Copolymerase and Bacterial Protein Tyrosine Kinase Adaptor Protein*. In *Journal of Bacteriology*, 197(1):120-7. <https://doi.org/10.1128/JB.02106-14>
- WHO. (2018). *Pneumococcus Surveillance Vaccine Preventable*.

WHO | Pneumococcal Disease. (2015). WHO.

- Willemse, J., Borst, J. W., de Waal, E., Bisseling, T., & van Wezel, G. P. (2010). *Positive control of cell division: FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of Streptomyces*. In *Genes & Development*, 25(1):89-99. <https://doi.org/10.1101/gad.600211>
- Winther, A. R., Kjos, M., Herigstad, M. L., Håvarstein, L. S., & Straume, D. (2020). EloR interacts with the lytic transglycosylase MltG at midcell in streptococcus pneumoniae R6. In *bioRxiv*. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.12.18.423453>
- Wong, D., Li, W., Chao, J. D., Zhou, P., Narula, G., Tsui, C., Ko, M., Xie, J., Martinez-Frailes, C., & Av-Gay, Y. (2018). *Protein tyrosine kinase, PtkA, is required for Mycobacterium tuberculosis growth in macrophages*. In *Scientific Report*, 8(1):155. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18547-9>
- Wu, J., Ohta, N., Zhao, J.-L., & Newton, A. (1999). *A novel bacterial tyrosine kinase essential for cell division and differentiation*. In *PNAS*, 96(23):13068-73. [www.pnas.org](http://www.pnas.org)
- Wugeditsch, T., Paiment, A., Hocking, J., Drummelsmith, J., Forrester, C., & Whitfield, C. (2001). Phosphorylation of Wzc, a Tyrosine Autokinase, Is Essential for Assembly of Group 1 Capsular Polysaccharides in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 276(4), 2361–2371. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009092200>
- Ye, W., Zhang, J., Shu, Z., Yin, Y., & Zhang, X. (2018). *Pneumococcal LytR Protein Is Required for the Surface Attachment of Both Capsular Polysaccharide and Teichoic Acids : Essential for Pneumococcal Virulence*. 9(June), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01199>
- Yeats, C., Finn, R. D., & Bateman, A. (2002). *The PASTA Domain: A Beta-Lactam-Binding Domain*. In *Trends in Biochemical Sciences*, 27(9):438. <http://tibs.trends.com>
- Yesilkaya, H., Farshchi Andisi, V., Andrew, P. W., & Bijlsma, J. J. E. (2013). Streptococcus pneumoniae and reactive oxygen species: an unusual approach to living with radicals. *Trends in Microbiology*, 21, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.01.004>
- Yother, J. (2011). *Capsules of Streptococcus pneumoniae and Other Bacteria: Paradigms for Polysaccharide Biosynthesis and Regulation*. In *Annual Review of Microbiology*, 65:563-81. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162944>
- Zapun, A., Vernet, T., & Pinho, M. G. (2008). The different shapes of cocci. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 32, Issue 2, pp. 345–360). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00098.x>
- Zhang, W., Collinet, B., Perrochia, L., Durand, D., & van Tilbeurgh, H. (2015). The ATP-mediated formation of the YgjD-YeaZ-YjeE complex is required for the biosynthesis of tRNA t<sub>6</sub> A in Escherichia coli. *Nucleic Acids Research*, 43(3), 1804–1817. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1397>
- Zhao, X., & Lam, J. S. (2002). WaaP of Pseudomonas aeruginosa is a novel eukaryotic type protein-tyrosine kinase as well as a sugar kinase essential for the biosynthesis of core lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4722–4730. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107803200>
- Zheng, J., He, C., Singh, V. K., Martin, N. L., & Jia, Z. (2007). Crystal structure of a novel prokaryotic Ser/Thr kinase and its implication in the Cpx stress response pathway. *Molecular Microbiology*, 63(5), 1360–1371. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05611.x>

- Zheng, J. J., Perez, A. J., Tsui, H.-C. T., Massidda, O., & Winkler, M. E. (2017). Absence of the KhpA and KhpB (JAG/EloR) RNA-Binding Proteins Suppresses the Requirement for PBP2b by Overproduction of FtsA in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/mmi.13847>
- Zhou, B., Semanjski, M., Orlovetskie, N., Bhattacharya, S., Alon, S., Argaman, L., Jarrous, N., Zhang, Y., Macek, B., Sinai, L., & Ben-Yehuda, S. (2019). Arginine dephosphorylation propels spore germination in bacteria. In *PNAS*, 116(28):14228-14237. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817742116>
- Zucchini, L., Mercy, C., Garcia, P. S., Cluzel, C., Gueguen-Chaignon, V., Galisson, F., Freton, C., Guiral, S., Brochier-Armanet, C., Gouet, P., & Grangeasse, C. (2017). PASTA repeats of the protein kinase StkP interconnect cell constriction and separation of *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Microbiology*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0069-3>