



HAL
open science

Résistance aux β -lactamines médiée par la L,D-transpeptidase YcbB chez *Escherichia coli*

Henri Voedts

► **To cite this version:**

Henri Voedts. Résistance aux β -lactamines médiée par la L,D-transpeptidase YcbB chez *Escherichia coli*. Biologie moléculaire. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT: 2022SORUS334 . tel-04263669

HAL Id: tel-04263669

<https://theses.hal.science/tel-04263669v1>

Submitted on 29 Oct 2023

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.



Sorbonne Université

Ecole doctorale 515 « Complexité du Vivant »

Centre de Recherche des Cordeliers, UMRS 1138, Equipe 12

Structures Bactériennes Impliquées dans la Modulation de la Résistance aux Antibiotiques

**Résistance aux β -lactamines médiée par la
L,D-transpeptidase YcbB chez *Escherichia coli***

Par **Henri B. G. Voedts**

Thèse de doctorat de Microbiologie

Dirigée par Jean-Emmanuel Hugonnet

Présentée et soutenue publiquement le 28 octobre 2022

Devant un jury composé de :

Pr. Alexandra Aubry, PU-PH Sorbonne Université

Dr. Ivo Gomperts Boneca, DR INSERM, Institut Pasteur

Dr. Emmanuelle Bouveret, DR CNRS, Institut Pasteur

Dr. Olivier Tenailon, DR INSERM

Pr. Jean-Emmanuel Hugonnet, PU Sorbonne Université

Présidente

Rapporteur

Rapporteuse

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

Je souhaite remercier tout d'abord les membres de mon jury de thèse : les rapporteurs, Emmanuelle Bouveret et Ivo Gomperts Boneca, les examinateurs, Alexandra Aubry et Olivier Tenaillon, pour avoir accepté d'évaluer mon travail, ainsi que Jean-Emmanuel Hugonnet pour l'encadrement de cette thèse.

La thèse est une étape cruciale dans la vie d'un futur chercheur. Bien que son déroulement soit parfois difficile, j'en garde d'excellents souvenirs, à la fois sur le plan professionnel avec tout l'enrichissement et l'évolution intellectuelle qu'elle m'a apportée, et sur le plan personnel avec de très belles rencontres qui ont changées ma vie.

Merci infiniment Jean-Emmanuel et Michel. Sans vous cette thèse n'aurait pas été la même. Merci de m'avoir appris la science, de m'avoir transmis tous vos conseils et vos encouragements. J'ai appris tellement de choses auprès de vous et j'espère, un jour, pouvoir moi aussi participer à la boucle de la connaissance et la retransmettre à d'autres étudiants.

Merci Guennadi de m'avoir fait confiance. Sans notre rencontre durant ma licence je n'aurai certainement pas fait cette thèse et je n'aurai peut-être même pas étudié la bactériologie. Merci pour les nombreuses discussions que nous avons pu avoir durant la thèse. Je n'oublierai jamais la contribution que tu as eue dans mon parcours.

Je veux remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Christophe Beloin, Damien Brégeon et Philippe Glaser, pour leurs conseils et leurs encouragements.

Je remercie les différents collaborateurs avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant ma thèse : Thierry Touzé et Hélène Barreteau (Université Paris-Saclay) ; Arnaud Gutierrez (Insitut Cochin) ; Waldemar Vollmer et Adam Lodge (Newcastle University) ; Sean Kennedy (Institut Pasteur) ; Natalie Strynadka et Nathanael Caveney (University of British Columbia).

Merci à tous les membres actuels et anciens de l'équipe 12. Je remercie spécialement Grazyna pour les milieux de culture, les décontaminations, les gâteaux et son soutien. Ton départ à la retraite a profondément marqué le laboratoire et ton absence se ressent chaque jour. Je remercie aussi Jean-Luc, Jean-Philippe et David pour leur bonne humeur et leur connaissance médicale très intéressante et complémentaire à la recherche fondamentale. Merci également à Matthieu pour ses connaissances inestimables en chimie et à Delphine pour son aide technique. Merci aux étudiants en thèse et aux stagiaires de longue durée avec qui j'ai traversé les épreuves du laboratoire. Je remercie particulièrement Constantin (dit l'ottoman), j'espère que tu survivras à ta thèse puis à ton service militaire au pays de la philosophie et de la démocratie !

Un profond merci à ma famille et à mes amis pour leur soutien inconditionnel pendant ces longues années d'études. Merci infiniment Papa, Maman, Isaure et les chats : Bouboule l'aristocrate, Attila le peureux, Patio l'athlète, Louxor dit Loulou et Fafnir le petit dernier ! C'est grâce à vous tous que j'aime la science et que je me suis embarqué dans cette voie.

Zainab, merci pour tous les moments partagés durant cette thèse. Ta rencontre fut la meilleure chose qui me soit arrivée.

« L'imagination gouverne le monde. »
Napoléon Bonaparte

Sommaire

Remerciements	1
Sommaire	2
Liste des figures	4
Liste des abréviations	5
Avant-propos	6
Introduction	7
1. Structure de l'enveloppe bactérienne	8
1.1 La membrane interne : fonction et structure.....	9
1.2 La membrane externe : fonction et structure.....	9
1.3 L'espace périplasmique.....	12
2. Le peptidoglycane	13
2.1 Fonction, structure et synthèse	13
2.1.1 Synthèse cytoplasmique.....	15
2.1.2 Translocation du lipide II	17
2.1.3 Synthèse périplasmique	19
2.2 Les Protéines de Liaisons à la Pénicilline	25
2.3 Les β -lactamines	30
2.4 Les hydrolases du peptidoglycane.....	39
2.5 Les L,D-transpeptidases	48
2.5.1 Fonctions des L,D-transpeptidases	50
2.5.2 Contournement des PBP par les L,D-transpeptidases	56
3. La réponse stringente	62
3.1 (p)ppGpp : synthèse, dégradation et régulation.....	62
3.2 Effets du (p)ppGpp	65
Objectifs	73
Résultats	74
1. Les endopeptidases partenaires de YcbB	75
Article 1	76
2. Identification des partenaires fonctionnels de YcbB	106
Article 2	107
3. Rôle du (p)ppGpp dans l'expression de la résistance aux β-lactamines médiée par YcbB	154

Article 3	155
Discussion	181
1. Le rôle des endopeptidases dans la synthèse du peptidoglycane	182
2. Les β -lactamines agissent sur la biosynthèse de plusieurs composants de l'enveloppe	183
3. Les β -lactamines augmentent la perméabilité de la membrane externe	183
4. L'activité glycosyltransférase de RodA est essentielle pour la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB	186
5. Le (p)ppGpp active la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB en diminuant l'expression des ARNr	187
Annexe	189
Bibliographie	210

Liste des figures

Figure 1. Structures des enveloppes de <i>Escherichia coli</i> et <i>Bacillus subtilis</i>	8
Figure 2. Synthèse cytoplasmique du peptidoglycane.....	17
Figure 3. Structure et changement de conformation de MurJ.	19
Figure 4. Synthèse périplasmique du peptidoglycane.	20
Figure 5. Structures des glycosyltransférases SEDS RodA de <i>Thermus thermophilus</i> et GT51 monofonctionnelle MgtA de <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Figure 6. Réactions de D,D-carboxypeptidation et D,D-transpeptidation catalysées par les PBP.	26
Figure 7. Structure de la surface moléculaire la PBP1b de <i>Escherichia coli</i>	28
Figure 8. Modèle proposé d'élargissement par les aPBP et les couples SEDS-bPBP.	29
Figure 9. Structures des classes de β -lactamines.....	33
Figure 10. Analogie structurelle entre le substrat des PBP et les β -lactamines.	34
Figure 11. Mécanismes de résistance aux β -lactamines chez les bactéries didermes.	38
Figure 12. Réactions catalysées par les hydrolases du peptidoglycane chez <i>Escherichia coli</i>	40
Figure 13. Modèle d'insertion des chaînes glycanes par les endopeptidases.	44
Figure 14. Recyclage du peptidoglycane chez <i>Escherichia coli</i>	48
Figure 15. Proportions de ponts de type 3 \rightarrow 3 dans diverses espèces bactériennes provenant de quatre phyla différents.	49
Figure 16. Structure de la L,D-transpeptidase modèle Ldt _{fm} de <i>Enterococcus faecium</i>	50
Figure 17. Réaction de L,D-transpeptidation catalysée par les L,D-transpeptidases.....	51
Figure 18. Mécanisme d'export de la toxine typhoïde médié par YcbB chez <i>Salmonella</i>	54
Figure 19. Modèle de maturation du peptidoglycane chez les mycobactéries.	56
Figure 20. Proportions de ponts 4 \rightarrow 3 et 3 \rightarrow 3 dans les mutants résistants à l'ampicilline de D344S.	57
Figure 21. Résistance aux β -lactamines médiée par Ldt _{fm} chez <i>Enterococcus faecium</i>	59
Figure 22. Résistance aux β -lactamines médiée par YcbB chez <i>Escherichia coli</i>	61
Figure 23. Schéma de synthèse et de dégradation du (p)ppGpp.....	64
Figure 24. Effet indirects du (p)ppGpp sur l'expression des gènes.....	67
Figure 25. Effets du (p)ppGpp sur la synthèse des nucléotides.....	68
Figure 26. Modèle proposé de réparation de l'ADN et de résolution des conflits entre réplication et transcription par le (p)ppGpp.....	71
Figure 27. Modèle rendant compte de l'action des β -lactamines sur l'enveloppe de <i>Escherichia coli</i>	185

Liste des abréviations

anhMurNAc	Acide 1,6-anhydro- <i>N</i> -acétyl-muramique
aPBP	PBP de classe A
BAM	« β -barrel Assembly Machinery »
bPBP	PBP de classe B
C55-P	Undécaprényl-phosphate
C55-PP	Undécaprényl-diphosphate
CMI	Concentration minimale inhibitrice
cPBP	PBP de classe C
DAP	Acide diaminopimélique
ECA	« Enterobacterial common antigens »
ECA_{LPS}	ECA lié à une molécule de LPS
ECA_{PGL}	ECA lié à un phosphatidylglycéride
GlcNAc	<i>N</i> -acétyl-glucosamine
GT51	Glycosyltransférase GT51
LDT	L,D-transpeptidase
Lpp	Lipoprotéine de Braun
LPS	Lipopolysaccharide
MurNAc	Acide <i>N</i> -acétyl-muramique
OMP	Protéine de membrane externe
PBP	Protéine de liaison à la pénicilline (Penicillin-Binding Protein)
PDB	« Protein Data Bank »
ppGpp	Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate
pppGpp	Guanosine 5'-triphosphate 3'-diphosphate
RNAP	ARN polymérase

Avant-propos

L'ère des antibiotiques a considérablement changé la médecine et la manière de traiter les maladies infectieuses. Depuis la découverte du premier antibiotique, la pénicilline, la synthèse du peptidoglycane est un sujet de recherche fondamentale et appliqué qui a permis l'identification et l'amélioration de nombreuses molécules utilisées aujourd'hui en thérapeutique.

Le peptidoglycane est une macromolécule qui entoure complètement les bactéries et qui est essentielle à leur survie. Le peptidoglycane est composé de chaînes glycanes reliées entre elles par de courtes tiges peptidiques. Chez la plupart des bactéries, la synthèse des ponts interpeptidiques est catalysée par les Protéines de Liaisons à la Pénicilline (Penicillin-Binding Protein ; PBP). Ces enzymes sont les cibles des antibiotiques de la famille des β -lactamines, comme la pénicilline qui en fut le premier représentant.

Parfois, la formation de ponts interpeptidiques peut également être catalysée par une autre famille d'enzymes non apparentées aux PBP, les L,D-transpeptidases (LDT). La formation de ponts interpeptidiques par les LDT est majoritaire chez certaines bactéries pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis* ou *Clostridium difficile*. Contrairement aux PBP, les LDT sont inefficacement inhibées par la plupart des β -lactamines et peuvent contribuer à la résistance à cette famille d'antibiotique dans des mutants de *Escherichia coli* sélectionnés en laboratoire. L'objectif de la thèse est d'étudier le mécanisme de résistance aux β -lactamines médiée par les LDT chez *E. coli*.

Le manuscrit commence par une introduction sur l'enveloppe bactérienne, le peptidoglycane et la réponse stringente et se termine sur les objectifs de la thèse. L'introduction est volontairement orientée sur la bactérie modèle *E. coli*. La partie résultat repose sur des articles scientifiques publiés ou en cours de publication, et se concentre sur l'identification des partenaires fonctionnels de YcbB dans la résistance aux β -lactamines ainsi que le rôle du (p)ppGpp dans l'activation du mécanisme de résistance. La dernière partie est une brève discussion sur l'impact des résultats présentés dans ce manuscrit. En plus de la réalisation des objectifs de la thèse, j'ai participé à une étude sur la structure de YcbB. Cette publication est présente en annexe à la fin du manuscrit.

Introduction

1. Structure de l'enveloppe bactérienne

Il existe deux grands groupes paraphylétiques de bactéries, les bactéries didermes et les bactéries monodermes, plus traditionnellement qualifiées respectivement de bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Gupta 1998). Les bactéries possèdent une enveloppe complexe avec de nombreuses variations de structures entre les espèces (Silhavy, Kahne, and Walker 2010). Généralement, l'enveloppe bactérienne est composée (i) d'une membrane interne, également nommée membrane cytoplasmique, qui délimite le cytoplasme du périplasma, (ii) d'un peptidoglycane, une structure osmoprotectrice présente dans le périplasma, et (iii) d'une membrane externe, présente uniquement chez les bactéries didermes, qui constitue une barrière de perméabilité supplémentaire. De nombreuses bactéries produisent également une couche externe de polysaccharides, la capsule, qui est parfois essentielle à leur virulence [voir (Sande and Whitfield 2021) pour une revue sur la capsule de *Escherichia coli* et de *Salmonella*]. Par ses propriétés physico-chimiques, l'enveloppe contribue à donner aux bactéries leur forme et à les protéger du milieu extérieur. L'enveloppe est une structure essentielle à la survie des bactéries, ce qui en fait une cible intéressante pour le développement d'antibiotiques. Les structures des enveloppes de *Escherichia coli* et de *Bacillus subtilis*, respectivement les deux principaux modèles de bactéries didermes et monodermes, sont présentées en Figure 1.

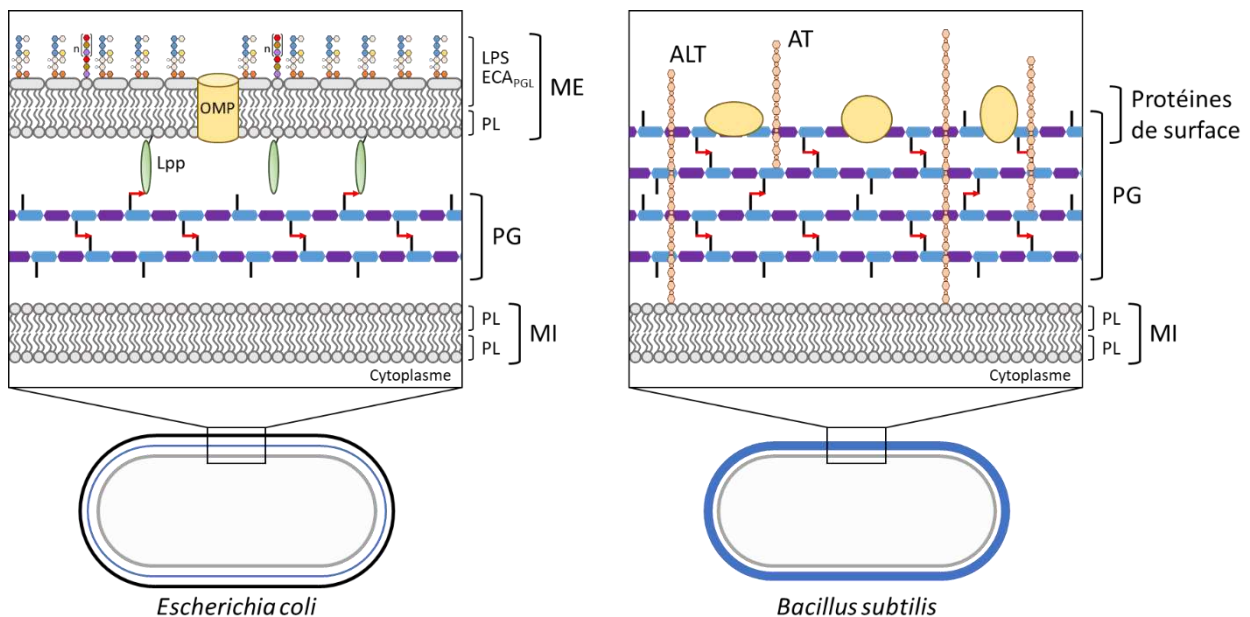


Figure 1. Structures des enveloppes de *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*.

Abréviations : ALT, acide lipotéichoïque ; AT, acide téichoïque ; ECA_{PGL}, « enterobacterial common antigen » lié à un phosphatidylglycéride ; Lpp, lipoprotéine de Braun ; LPS, lipopolysaccharide ; ME,

membrane externe ; IM, membrane interne ; OMP, protéine de membrane externe ; PG, peptidoglycane ; PL, phospholipide.

1.1 La membrane interne : fonction et structure

La membrane interne, ou membrane cytoplasmique, constitue la barrière protectrice qui sépare le cytoplasme du périplasma (Silhavy et al. 2010). La membrane interne est le siège de nombreuses réactions métaboliques comme la synthèse de certaines protéines, la production d'ATP grâce à la chaîne respiratoire, ou encore la synthèse des polymères de surface bactériens comme le peptidoglycane. La membrane interne est une bicouche lipidique constituée de phospholipides dans les feuillet externe et interne. Ces phospholipides sont à 75% des phosphatidylethanolamines et à 20% des phosphatidylglycérols, les 5% restants sont un mélange de phosphatidylsérines, de cardiolipines et d'undécaprényls mono et diphosphates (Raetz and Dowhan 1990). De nombreuses protéines sont présentes dans la membrane interne. Elles sont intégralement logées à l'intérieur de la membrane interne par des régions transmembranaires, ou ancrées par une seule hélice α hydrophobe et ainsi exposées vers le cytoplasme ou le périplasma. Certaines protéines de la membrane interne sont bitopiques et interagissent avec d'autres protéines dans le cytoplasme et dans le périplasma.

1.2 La membrane externe : fonction et structure

La membrane externe est uniquement présente chez les bactéries didermes. La membrane externe est en contact avec le milieu extérieur et sert de barrière de perméabilité contre de nombreuses molécules toxiques (Nikaido 2003). Outre son rôle de barrière chimique, des études récentes ont montré que la membrane externe a également un rôle dans les propriétés mécaniques de l'enveloppe bactérienne, notamment dans sa rigidité et dans sa capacité à supporter des déformations (Sun et al. 2021). La membrane externe est également impliquée dans des interactions hôte-pathogène, elle représente un facteur de virulence important et est l'une des cibles bactériennes détectées par le système immunitaire inné. La membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique constituée de phospholipides dans le feuillet interne et de glycolipides dans le feuillet externe. Le système Mla (pour « Maintenance of outer membrane Lipid Asymmetry » en anglais) permet à la bactérie de s'assurer de l'asymétrie de la membrane externe en participant au transport rétrogrades vers la membrane interne des phospholipides présents dans le feuillet externe de la membrane externe (Malinverni and Silhavy 2009). Chez *Escherichia coli*, les

glycolipides sont principalement des lipopolysaccharides (LPS, 97% du feuillet externe de la membrane externe) et des « enterobacterial common antigens » (ECA) lié à des phosphatidylglycérides (ECA_{PGL}).

Le LPS est une molécule à fort potentiel inflammatoire et est responsable des chocs septiques causés par les bactéries didermes (Raetz and Whitfield 2002). Le LPS est constitué de 3 sous-parties : le Lipide A, le noyau oligosaccharidique et l'antigène O. Le Lipide A est formé de 2 molécules de *N*-acétyl-glucosamine phosphorylés et acylés par 6 à 7 chaînes d'acides gras saturés. C'est le Lipide A qui interagit avec les phospholipides du feuillet interne de la membrane externe. Le noyau oligosaccharidique est formé de plusieurs sucres dont du 3-deoxy-D-manno-octulosonate, du D-manno-heptose (dont certains sont phosphorylés), du D-glucose ou encore du D-galactose ancrés à un *N*-acétyl-glucosamine du Lipide A. Il existe beaucoup de variations dans le noyau oligosaccharidique du LPS au sein de la même espèce. L'antigène O est la partie la plus distale de la membrane externe, il est constitué de plusieurs sucres dont les variations sont encore plus importantes que pour le noyau du LPS. La souche non pathogène de *E. coli* K-12, la plus couramment utilisée en laboratoire, ne présente pas d'antigène O à sa surface à cause d'une séquence d'insertion dans le premier gène impliqué dans la synthèse de l'antigène O. Les LPS sont synthétisés dans le feuillet interne de la membrane interne puis sont transloqués par MsbA dans le feuillet externe et transportés jusqu'à la membrane externe par le système Lpt. Le LPS est essentiel à la survie de *E. coli* et joue un rôle primordial de barrière contre les molécules du milieu extérieur (Nikaido 2003). Les liaisons hydrogènes entre les sucres des LPS ainsi que la présence de cations qui neutralisent les groupements phosphates des LPS contribuent à la stabilité de la membrane externe. De plus, les chaînes d'acides gras du LPS sont saturées et permettent la formation d'une membrane très compacte et peu fluide, contrairement aux membranes formées uniquement par des phospholipides. L'essentialité des LPS en fait une cible intéressante pour le développement d'antibiotiques ciblant spécifiquement les bactéries didermes. Des quinoléines modifiées inhibant la translocase MsbA ont justement été identifiées et pourraient servir d'échafaudage moléculaire pour le développement d'autres molécules (Alexander et al. 2018; Ho et al. 2018).

Les ECA_{PGL} sont constitués d'un phosphatidylglycéride et d'une sous-unité de 3 sucres (*N*-acétyl-D-glucosamine, acide *N*-acétyl-D-manno-saminuronique et 4-acetamido-4,6-dideoxy-D-fucose) répétée 7 à 14 fois (Rai and Mitchell 2020). Ce polymère d'ECA de 7 à 14 sous-unités peut également être ancré au LPS à la place de l'antigène O (ECA_{LPS}). La sous-unité des ECA est synthétisée dans le feuillet interne de la membrane interne sur un transporteur lipidique (l'undécaprényle phosphate) puis est transloquée vers le feuillet externe. Les ECA sont ensuite polymérisés dans le périplasme puis transportés jusqu'à la

membrane externe. L'enzyme responsable de la synthèse des ECA_{PGL} n'est pas connue, et l'enzyme Waal est responsable de la synthèse des ECA_{LPS}.

La membrane externe est également constituée de nombreuses protéines appartenant majoritairement à deux classes : (i) les lipoprotéines, ancrées de façon covalente à un phospholipide par un résidu cystéine et (ii) les protéines en tonneaux β , insérées à l'intérieur de la membrane externe (également nommées OMP pour « Outer Membrane Proteins » en anglais) (Silhavy et al. 2010).

Chez *E. coli* il existe une centaine de lipoprotéines dont la plupart ont des fonctions inconnues (Braun and Hantke 2019). Certaines sont impliquées dans la réponse à des stimuli externes pour transduire un signal jusqu'au cytoplasme (comme RcsF, qui a la particularité de posséder un domaine senseur qui peut s'orienter vers le milieu extérieur et détecter des défauts de l'enveloppe), d'autres sont impliquées dans la régulation de l'activité d'enzymes périplasmiques (comme LpoA et LpoB qui activent respectivement les PBP1a et PBP1b) et certaines possèdent des activités enzymatiques (comme l'endopeptidase MepS). Chez les *Proteobacteria*, une lipoprotéine particulière dénommée Lipoprotéine de Braun (Lpp) est ancrée au peptidoglycane par un résidu lysine en position C-ter (Braun and Wolff 1970; Hantke and Braun 1973). Lpp constitue le seul lien covalent entre la membrane externe et le peptidoglycane. Lpp est par conséquent importante pour les propriétés mécaniques de l'enveloppe et c'est d'ailleurs la protéine la plus abondante chez *E. coli* (environ 10^6 copies de Lpp par cellule). Une autre lipoprotéine, Pal, est également impliquée dans la liaison entre la membrane externe et le peptidoglycane mais le lien n'est pas covalent et repose sur des interactions faibles. Pal a également la particularité d'interagir avec d'autres protéines (TolABQR) et de former un complexe permettant un lien entre la membrane externe et la membrane interne (complexe Tol-Pal). La synthèse d'une lipoprotéine se fait d'abord par la synthèse d'une protéine insérée dans la membrane interne par un segment transmembranaire, cette protéine est ensuite modifiée pour en faire une lipoprotéine, puis elle est exportée vers la membrane externe par le système Lol (pour « Localization of lipoproteins » en anglais).

Grâce à leur forme en tonneaux β (enchaînement de feuillets β repliés en cylindre), certaines OMP sont des porines qui permettent la diffusion passive à travers la membrane externe de nombreuses molécules (comme OmpF et OmpC) ou de molécules spécifiques (comme LamB, permettant l'entrée spécifique du maltose) (Rollauer et al. 2015). Ces porines sont très abondantes et participent à la stabilité de la membrane externe. Une OMP particulière, OmpA, présente des propriétés de porines mais possède également un segment périplasmique qui interagit de façon non covalente avec le peptidoglycane et participe au maintien de la structure de l'enveloppe. Les OMP sont synthétisées dans le cytoplasme,

transloquées non-repliées dans le périplasma puis transportées grâce à des chaperonnes jusqu'au complexe BAM (pour « β -Barrel Assembly Machinery » en anglais) qui permet de les replier et de les insérer dans la membrane externe. Une étude récente a montré que la synthèse des OMP et la synthèse du peptidoglycane se faisait de manière synchrone (Mamou et al. 2022). Tout comme les LPS, le système BAM est également une cible intéressante pour le développement de nouveaux antibiotiques pour cibler les bactéries didermes [voir (Choi and Lee 2019) pour une revue sur les inhibiteurs de la synthèse de la membrane externe].

1.3 L'espace périplasmique

Le périplasma est l'espace qui sépare la membrane interne de la membrane externe chez les bactéries didermes, ou l'espace à proximité de la membrane interne chez les bactéries monodermes (Matias and Beveridge 2005; Silhavy et al. 2010; Zuber et al. 2006). C'est un compartiment cellulaire unique, plus visqueux que le cytoplasme, où de nombreuses réactions enzymatique ont lieu en absence d'ATP (Mullineaux et al. 2006). Le périplasma est particulièrement sensible aux changements de conditions physico-chimiques du milieu extérieur et de nombreuses protéines impliquées dans les réponses aux stress y sont présentes. Chez *E. coli* ces principaux systèmes de réponse aux stress de l'enveloppe sont les systèmes Cpx, Rcs, Bae, Psp et Rse [voir (Delhaye, Collet, and Laloux 2019) pour une revue sur le sujet]. Comme vu précédemment, le périplasma est le lieu de transit des différents composants de la membrane externe. De nombreuses chaperonnes et enzymes impliquées dans le transport de métabolites y sont présents. Des machineries multiprotéiques parcourent ce compartiment tel que les flagelles, les systèmes de pompes à efflux, ou les systèmes de sécrétion par exemple. Chez *E. coli* le périplasma a une épaisseur d'environ 25 nm et cette épaisseur dépend de la longueur de Lpp (Asmar et al. 2017). Une augmentation de la taille du périplasma empêche la transduction de signaux depuis la membrane externe vers la membrane interne et diminue l'intégrité de l'enveloppe (Mandela et al. 2022). Enfin, le périplasma est principalement le lieu de synthèse du peptidoglycane, qui sera développé en détail dans le chapitre suivant.

2. Le peptidoglycane

2.1 Fonction, structure et synthèse

Fonction. Le peptidoglycane, également dénommé sacculus ou muréine, est un composant unique et essentiel de la plupart des bactéries. Il s'agit d'une structure macromoléculaire tridimensionnelle (10^9 kDa) en forme de « filet » qui entoure les bactéries et leur confère leur forme (Höltje 1998). Le peptidoglycane mesure en général moins de 10 nm d'épaisseur chez les bactéries didermes mais peut aller de 30 à 100 nm chez les bactéries monodermes (Matias et al. 2003; Silhavy et al. 2010). Le peptidoglycane sert principalement de protection contre la pression osmotique exercée par le cytoplasme (pression d'environ 3 atm) (Cayley, Guttman, and Record 2000; Vollmer, Blanot, and De Pedro 2008). Le peptidoglycane permet également l'ancrage de nombreux polymères. Chez *E. coli*, comme vu au chapitre 1.2, le peptidoglycane permet un lien avec la membrane externe par l'intermédiaire de Lpp (liaison covalente), OmpA et Pal (liaisons faibles). Chez les bactéries monodermes, des protéines de surface, des polysaccharides capsulaires et des acides téichoïques sont attachés au peptidoglycane de façon covalente (Dramsi et al. 2008; Neuhaus and Baddiley 2003). Les acides téichoïques sont essentiels et participent à la flexibilité de l'enveloppe des bactéries monodermes.

Structure. Le mot « peptidoglycane » tire son nom de ses 2 composants principaux : (i) des chaînes glycanes constituées de répétitions de disaccharides et (ii) des courtes tiges peptidiques qui relient entre elles les chaînes glycanes (Höltje 1998). La structure et la synthèse du peptidoglycane varient en fonction des différentes espèces, mais nous allons principalement détailler celles de *E. coli* en évoquant quelques variations retrouvées dans d'autres bactéries [voir (Vollmer et al. 2008) pour une revue]. Les différents fragments de peptidoglycane sont communément regroupés sous le terme muropeptides.

Les chaînes glycanes du peptidoglycane sont constituées de la répétition de *N*-acétyl-glucosamine (GlcNAc) et d'acide *N*-acétyl-muramique (MurNAc) reliés par une liaison β -1,4 (Figure 2). La taille de ces chaînes glycanes peut beaucoup varier. Chez *E. coli* elles sont en moyenne de 25 sous-unités dans des bactéries en phase exponentielle de croissance et peuvent atteindre jusqu'à 200 sous-unités (Höltje 1998; Turner, Vollmer, and Foster 2014). Par conséquent, une chaîne glycane ne permet pas d'entourer toute la circonférence de la bactérie, mais en étant reliée à d'autres chaînes elles forment une structure discontinue de chaînes glycanes qui entoure *in fine* la bactérie. Chez la plupart des bactéries didermes, les

extrémités des chaînes glycanes se terminent par un 1,6-anhydroMurNAc (anhMurNAc) qui contient une liaison intramoléculaire entre les carbones C1 et C6 (Höltje 1998). Ces anhMurNAc sont les produits de dégradation des chaînes glycanes par une famille d'enzyme appelée transglycosylases lytiques. Les molécules d'anhMurNAc peuvent être recyclées et servir notamment de molécules signales pour l'induction de β -lactamases (Höltje et al. 1994). Il existe certaines modifications sur les sucres, notamment la *N*-déacétylation, la *O*-acétylation ou la *N*-glycolylation mais elles sont absentes chez *E. coli* (Vollmer et al. 2008).

Les chaînes glycanes sont reliées entre elles par l'intermédiaire de tiges peptidiques portées par les groupements lactoyl des résidus MurNAc. Dans le peptidoglycane, cette tige est généralement constituée de 2 à 5 résidus d'acides aminés. Chez les didermes comme *E. coli*, la tige pentapeptide présente dans la sous-unité du peptidoglycane est généralement composée de L-alanine¹- γ -D-glutamate²-acide 2,6-diaminopimélique³-D-alanine⁴-D-alanine⁵ (Vollmer et al. 2008). La présence d'acide aminés de conformation D est particulièrement rare dans la nature et permet au peptidoglycane de résister à la plupart des peptidases (Cava, Lam, et al. 2011). La modification la plus courante, retrouvée généralement chez les monodermes, est le remplacement de l'acide diaminopimélique (DAP) en position 3 par une L-lysine. Cette L-Lys³ peut également être reliée par son carbone ϵ à une chaîne latérale d'acides aminés (5 glycines chez *Staphylococcus aureus*, D-Asp ou D-Asn chez *Enterococcus faecium*, L-Ala-L-Ala chez *Enterococcus faecalis*, et L-Ser-L-Ala ou L-Ala-L-Ala chez *Streptococcus pneumoniae* par exemple) (Vollmer et al. 2008). L'amidation des résidus D-Glu² et/ou DAP³ est également retrouvée chez certaines espèces mais est absente chez *E. coli*. Dans le périplasma les tiges peptidiques peuvent être modifiées et les D-Ala⁴ ou D-Ala⁵ peuvent être remplacées par des résidus Gly. Chez les didermes, deux tiges peptidiques adjacentes peuvent être directement reliées entre elles par une liaison entre le D-Ala⁴ et le DAP³, ou par une liaison entre deux résidus DAP³ (ponts de type 4 \rightarrow 3 et 3 \rightarrow 3, respectivement). Chez les monodermes, ces deux types de ponts existent également sauf que les ponts 4 \rightarrow 3 relie la D-Ala⁴ à la L-Lys³ (ou à sa chaîne latérale) et les ponts 3 \rightarrow 3 relie la L-Lys³ à une autre L-Lys³ (ou à sa chaîne latérale). La proportion de tiges peptidiques impliquées dans des ponts interpeptidiques varie en fonction du mode de croissance et de l'espèce. Chez *E. coli* et *Neisseria gonorrhoeae* par exemple, en phase exponentielle de croissance environ 30 à 50% des tiges peptidiques sont impliquées dans des ponts interpeptidiques, alors que cette proportion monte à 70-80% chez *Staphylococcus aureus* (Ghuysen 1968; Glauner, Holtje, and Schwarz 1988). Ces ponts interpeptidiques du peptidoglycane sont à la base de la structure en forme de « filet » du peptidoglycane et leur formation sera abordée en détail dans les chapitres suivants.

Les techniques d'imagerie, notamment la microscopie de force atomique et la cryo-électro microscopie, nous offrent une meilleure compréhension de la structure macromoléculaire du peptidoglycane. Chez *E. coli* les chaînes glycanes sont perpendiculaires à l'axe polaire de la cellule (Verwer et al. 1978). Les groupements lactoyl du MurNAc orientent les tiges peptidiques dans des directions différentes, ce qui les arrange ainsi en hélice autour des chaînes glycanes avec des angles de 90° entre chaque tige peptidique (Gan, Chen, and Jensen 2008; Vollmer and Höltje 2004). Le peptidoglycane peut facilement et rapidement changer de taille en fonction de la pression osmotique grâce à une élasticité provenant principalement des tiges peptidiques (Rojas, Theriot, and Huang 2014). Les sacculi purifiés gardent leur forme et leur taille qui correspond à peu près à celle d'une cellule entière (environ 2 à 4 µm de longueur et 0.5 à 1 µm de largeur).

La synthèse du peptidoglycane est couramment divisée en 2 grandes étapes avec plusieurs réactions enzymatiques : une étape cytoplasmique de synthèse du précurseur disaccharide-pentapeptide et une étape périplasmique de polymérisation. Les étapes de la synthèse cytoplasmique du peptidoglycane sont généralement réalisées par des enzymes uniques qui sont par conséquent essentielles, alors que les étapes de la synthèse périplasmique sont souvent réalisées par plusieurs enzymes aux fonctions redondantes. La synthèse du peptidoglycane est la cible de nombreux antibiotiques et nous évoquerons les plus pertinents d'entre eux au fur et à mesure de la description des différentes étapes de synthèse du peptidoglycane.

2.1.1 Synthèse cytoplasmique

La synthèse de la sous-unité du peptidoglycane commence dans le cytoplasme par la formation d'un précurseur nucléotidique qui deviendra lipidique avant d'être exporté vers le périplasma (Figure 2). Les enzymes GlmSMU vont convertir une molécule de fructose-6-phosphate en uridine 5'-pyrophosphate-*N*-acetyl-glucosamine (UDP-GlcNAc). Grâce à une molécule de L-glutamate, GlmS va d'abord convertir le fructose-6-phosphate en glucosamine-6-phosphate, puis GlmM va l'interconvertir en glucosamine-1-phosphate (Badet et al. 1987; Mengin-Lecreux and Van Heijenoort 1994). Grâce à ses deux domaines, GlmU va à la fois acétyler et urydiler la glucosamine-1-phosphate grâce à une molécule d'acétyl-CoA et une molécule d'UTP pour former l'UDP-GlcNAc (Mengin-Lecreux, Van Heijenoort, and Park 1996; Mengin Lecreux et al. 1993). L'UDP-GlcNAc est ensuite converti en UDP-MurNAc ou est directement utilisé pour former le lipide II (voir plus bas). L'UDP-GlcNAc est également utilisé dans la synthèse des LPS et des ECA.

L'UDP-GlcNAc est converti en UDP-MurNAc en deux étapes par les enzymes MurAB. MurA ajoute un groupement énoypyruvate à l'UDP-GlcNAc à partir d'une molécule de phosphoénoypyruvate, et MurB réduit le groupement énoypyruvate en D-lactoyl, formant ainsi l'UDP-MurNAc. La réaction catalysée par

MurA est la première étape qui engage le devenir d'une molécule d'UDP-GlcNAc vers la synthèse du peptidoglycane (Benson et al. 1993; Marquardt et al. 1992). Le groupement lactoyl ainsi formé par MurAB servira de site de synthèse non ribosomique de la tige peptidique. La fosfomycine, un analogue du phosphoénolpyruvate utilisé notamment dans le traitement des infections urinaires à *E. coli*, inhibe MurA et bloque ainsi la synthèse des précurseurs du peptidoglycane (Kahan et al. 1974).

Les acides aminés de la tige peptidique sont rajoutés sur l'UDP-MurNAc par les amino acyle ligases ATP-dépendantes MurCDEF pour former l'UDP-MurNAc-pentapeptide, également appelé nucléotide de Park (en hommage à James T. Park pour sa contribution à la recherche sur le peptidoglycane). Le premier acide aminé, le L-Ala¹, est ajouté par MurC pour former l'UDP-MurNAc-L-Ala¹ (Liger et al. 1995). Bien que MurC présente une stéréospécificité stricte et ne peut pas incorporer de D-Ala, MurC est capable d'ajouter des résidus non-canoniques L-Ser ou Gly à la place du L-Ala¹. La protéine PgeF (YfiH) permet d'éviter ces incorporations délétères et de maintenir la composition du peptidoglycane (Parveen and Reddy 2017). Le second acide aminé, le D-Glu², est ajouté à la suite du L-Ala¹ par MurD pour former l'UDP-MurNAc-L-Ala¹-D-Glu² (Pratviel-Sosa, Mengin-Lecreulx, and van Heijenoort 1991). Le D-Glu² est formé à partir de L-Glu par la racémase Murl (Doublet et al. 1993). Le troisième acide aminé, le *meso*DAP³, un intermédiaire de la synthèse de L-lysine, est incorporé par MurE sur le carbone γ du D-Glu² pour former l'UDP-MurNAc-L-Ala¹- γ -D-Glu²-DAP³ (Michaud et al. 1990). Le *meso*DAP³ est formé à partir de L,L-DAP par l'épimérase DapF (Richaud et al. 1987). En absence de DapF, MurE est capable d'incorporer du L,L-DAP mais l'efficacité de la réaction est beaucoup plus faible à cause d'une différence d'un facteur 3000 entre le *K_m* du *meso*DAP et du L,L-DAP (Mengin-Lecreulx et al. 1988). Les quatrièmes et cinquièmes acides aminés, les D-Ala⁴ et D-Ala⁵, sont ajoutés en même temps sous la forme d'un dipeptide D-Ala⁴-D-Ala⁵ par MurF pour former l'UDP-MurNAc-L-Ala¹- γ -D-Glu²-DAP³-D-Ala⁴-D-Ala⁵ (Duncan, van Heijenoort, and Walsh 1990). Certaines bactéries résistantes à la vancomycine sont également capables d'incorporer un dipeptide D-Ala⁴-D-Ser⁵ ou D-Ala⁴-D-Lac⁵ (Stogios and Savchenko 2020). Pour former le dipeptide D-Ala⁴-D-Ala⁵, le L-Ala est converti par les alanine racémases Alr et DadX, et le dipeptide est formé par les D-alanine-D-alanine ligases DdlA et DdlB (Wijsman 1972; Wild et al. 1985; Zawadzke, Bugg, and Walsh 1991). Curieusement, la racémisation du L-Ala et la ligation du dipeptide de D-Ala sont les deux seules étapes de synthèse cytoplasmique du peptidoglycane catalysées par des enzymes aux fonctions redondantes. L'antituberculeux D-cyclosérine, un analogue du D-Ala, est un inhibiteur des alanines racémases et des D-alanine-D-alanine ligases (Neuhaus and Lynch 1964).

L'UDP-MurNac-pentapeptide est ensuite pris en charge par la transférase MraY qui catalyse le transfert du phospho-MurNac-pentapeptide sur le groupement phosphate d'un transporteur lipidique membranaire, l'undécaprényl phosphate (C₅₅-P), formant ainsi l'intermédiaire lipide I (Ikeda et al. 1991). Le C₅₅-P est synthétisé dans le cytoplasme par l'enzyme UppS (IspU) sous la forme d'undécaprényl diphosphate (C₅₅-PP) qui est ensuite déphosphorylé pour donner le C₅₅-P. Il existe quatre C₅₅-PP phosphatases connues chez *E. coli* : BacA, YbjG, PgpB et LpxT, mais leur activité a été démontrée pour le recyclage du transporteur lipidique depuis le périplasma et l'enzyme responsable de la déphosphorylation du C₅₅-PP en C₅₅-P dans le cytoplasme n'est toujours pas identifiée [voir (Manat et al. 2014) pour une revue]. La transférase MurG catalyse ensuite le transfert d'un GlcNac sur le lipide I à partir d'une molécule d'UDP-GlcNac, formant ainsi le lipide II (Mengin-Lecreux et al. 1991).

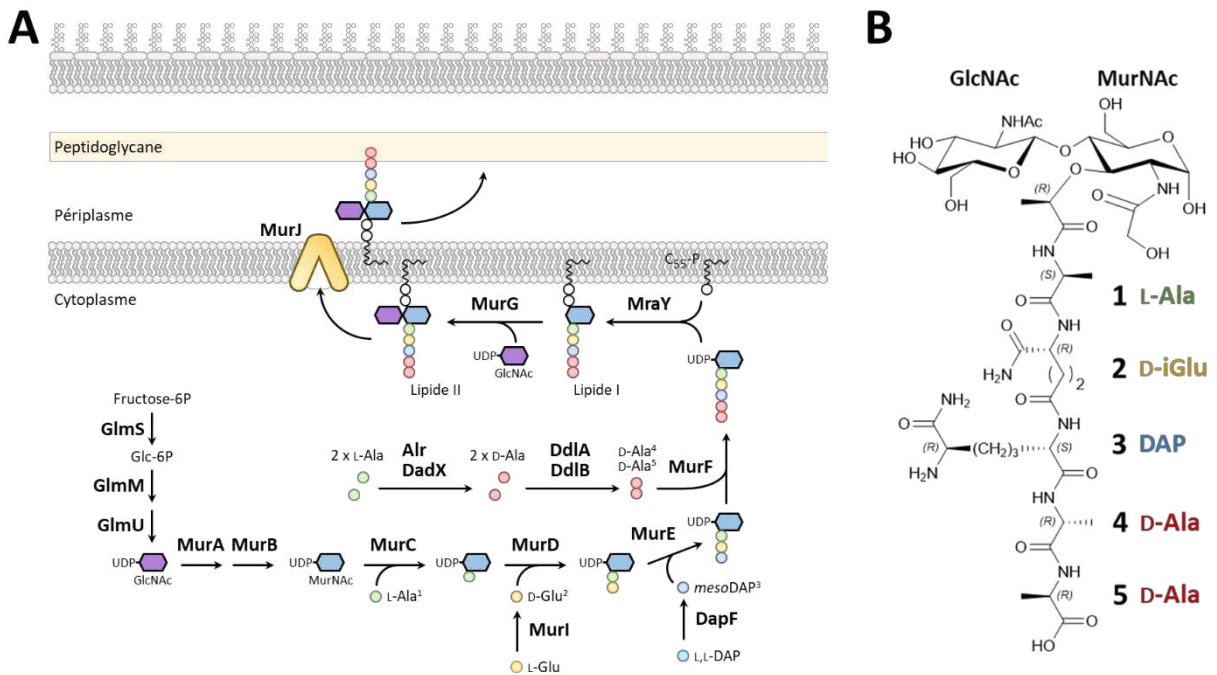


Figure 2. Synthèse cytoplasmique du peptidoglycane.

(A) Les sucres GlcNac et MurNac ainsi que la chaîne pentapeptide sont synthétisés dans le cytoplasme. Le lipide II, constitué de la sous-unité disaccharide-pentapeptide et du transporteur C₅₅, est transloquée jusqu'au périplasma où la polymérisation du peptidoglycane a lieu. (B) Structure de la sous-unité du peptidoglycane, le GlcNac-MurNac-pentapeptide.

2.1.2 Translocation du lipide II

Une fois le lipide II synthétisé dans le feuillet interne de la membrane interne, il doit être exporté dans le périplasma pour pouvoir être utilisé comme substrat dans la synthèse du peptidoglycane. Une protéine responsable de la translocation du lipide II depuis le feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane

interne a été recherchée pendant longtemps car la vitesse de translocation passive du lipide II à travers la membrane n'est pas suffisante pour soutenir la synthèse du peptidoglycane (Weppners and Neuhaus 1978). MurJ et FtsW sont les deux protéines membranaires régulièrement présentées comme étant les translocases (« flippase » en anglais) de *E. coli*, bien que l'attribution de cette fonction à FtsW est actuellement débattue et remise en question.

La fonction de la première translocase du lipide II, MurJ, a d'abord été prédite par analyse bioinformatique (Ruiz 2008). Il s'agit d'une protéine de la superfamille des transporteurs MOP (pour « Multidrug, Oligosaccharidyl-lipid, Polysaccharide » en anglais), dont d'autres membres sont également impliqués dans la translocation de C₅₅-PP lié à l'antigène O pour la synthèse de la membrane externe (Hvorup et al. 2003). Des mutants thermosensibles de MurJ ont d'abord été identifiés et ont permis de mettre en évidence l'essentialité de ce gène (Inoue et al. 2008). À température restrictive, ces mutations ont entraîné la lyse bactérienne et une accumulation de précurseurs lipidiques du peptidoglycane, indiquant un rôle très probable de MurJ dans la synthèse du peptidoglycane. L'activité translocase de MurJ a ensuite été démontrée par des expériences *in vivo* en analysant le produit de la colicine M (qui coupe la liaison entre l'undécaprényl et le reste du lipide II) et l'accumulation des lipides dans différents mutants de MurJ (Sham et al. 2014). D'autres études ont par la suite montré que MurJ était capable d'adopter deux conformations, l'une faisant face au cytoplasme et l'autre faisant face au périplasma (Figure 3) (Kuk, Mashalidis, and Lee 2017). Les auteurs proposent que la fixation du lipide II à MurJ, lorsque la protéine est orientée vers le cytoplasme, induit un changement de conformation qui oriente MurJ vers le périplasma, permettant ainsi la translocation du lipide II à travers la membrane interne. Une fois le lipide II utilisé dans le périplasma, le retour à une conformation orientée vers le cytoplasme se ferait grâce au potentiel de membrane, car la dépolarisation des membranes entraîne le blocage de MurJ dans sa conformation orientée vers le périplasma (Rubino et al. 2018).

FtsW appartient à la famille des protéines SEDS (pour « Shape, Elongation, Division and Sporulation » en anglais). Le rôle de FtsW comme translocase repose principalement sur une étude dans laquelle les auteurs ont utilisé un fluorophore sur des analogues de lipide II pour identifier une activité translocase dans des vésicules membranaires en surproduisant FtsW (Mohammadi et al. 2011). Ce système a montré une activité translocase plus faible pour MurJ que pour FtsW. Néanmoins, plusieurs arguments contre l'activité translocase de FtsW sont présentés dans la littérature.

L'étude sur MurJ de (Sham et al. 2014) a montré que l'activité translocase des cellules n'était pas réduite lorsque la quantité de FtsW était drastiquement diminuée, suggérant que MurJ est bien la seule

translocase de *E. coli*. Une autre étude basée sur de la spectrométrie de masse a montré une affinité du lipide II plus grande pour MurJ que pour FtsW (Bolla et al. 2018). Une étude de microscopie a démontré que MurJ est localisée le long de la paroi latérale et également dans le septum, suggérant que cette translocase pourrait alimenter à elle seule le processus d'élongation et de division (Liu et al. 2018). Plusieurs études démontrent maintenant que FtsW et son homologue RodA sont des glycosyltransférases capables de synthétiser les chaînes glycanes à partir de lipide II (voir chapitre 2.1.3) (Meeske et al. 2016; Taguchi et al. 2019). Néanmoins, toutes ces études ne permettent pas d'éliminer la possibilité que FtsW pourrait avoir à la fois une activité translocase et une activité glycosyltransférase.

Une fois dans le périplasma, le lipide II est la cible de nombreux antibiotiques ne pénétrant pas la membrane interne et pénétrant en général peu la membrane externe des bactéries didermes. Les glycopeptides (comme la vancomycine) se fixent à l'extrémité D-Ala⁴-D-Ala⁵ des tiges peptidiques et empêchent les enzymes de synthèse du peptidoglycane d'interagir avec le lipide II (Stogios and Savchenko 2020). La teixobactine, un polypeptide non ribosomique, déstabilise la membrane interne et empêche l'interaction avec les enzymes de synthèse du peptidoglycane en interagissant avec les groupements phosphates du lipide II (Ling et al. 2015; Shukla et al. 2020). La colicine M, une bactériocine produite par certaines souches de *E. coli*, dégrade le lipide II en hydrolysant la liaison entre le groupement phosphate et le C₅₅ (El Ghachi et al. 2006).

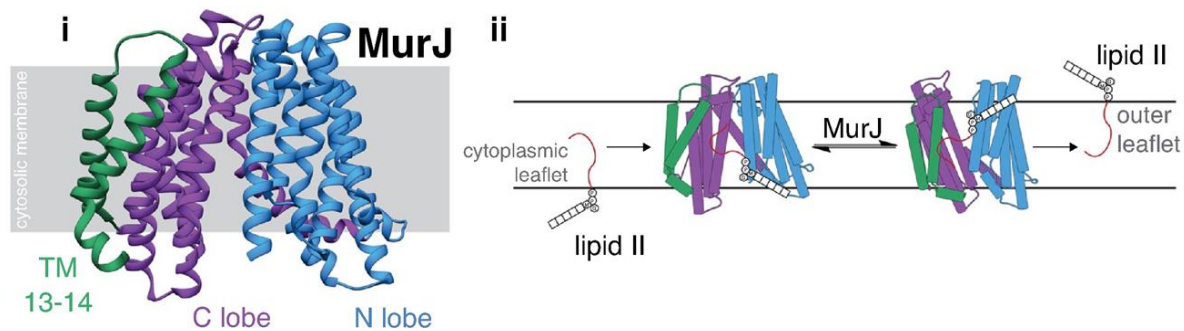


Figure 3. Structure et changement de conformation de MurJ.

(i) Structure de MurJ de *Thermosipho africanus* (PDB 5T77) dans sa conformation ouverte vers le cytoplasme. Le lobe N en bleu, le lobe C en violet et le segment transmembranaire 13-14 en vert forme une structure en N dans laquelle se loge le lipide II. (ii) La translocation du lipide II nécessite un changement de conformation de MurJ de sa forme en N ouverte vers le cytoplasme vers une forme en V ouverte vers le périplasma. Figure provenant de la référence (Caveney, Li, and Strynadka 2018).

2.1.3 Synthèse périplasmique

La synthèse périplasmique du peptidoglycane nécessite plusieurs activités catalytiques essentielles : (i) la transglycosylation, qui permet la polymérisation des chaînes glycanes, et (ii) la transpeptidation, qui

permet la réticulation du peptidoglycane en reliant les chaînes glycanes entre elles (Figure 4). Les enzymes qui catalysent ces deux réactions sont les glycosyltransférases et les transpeptidases, respectivement (les transpeptidases seront abordées en détail dans les chapitres dédiés 2.2 et 2.5). Les fonctions « opposées » à ces deux réactions de synthèse, (iii) la dégradation des chaînes glycanes et (iv) la dégradation des ponts interpeptidiques, sont également essentielles à la croissance du peptidoglycane. Les enzymes qui assurent ces fonctions de dégradations, communément appelées hydrolases, sont les transglycosylases lytiques, les amidases, les endopeptidases et les carboxypeptidases (ces enzymes seront abordées en détail dans le chapitre 2.4).

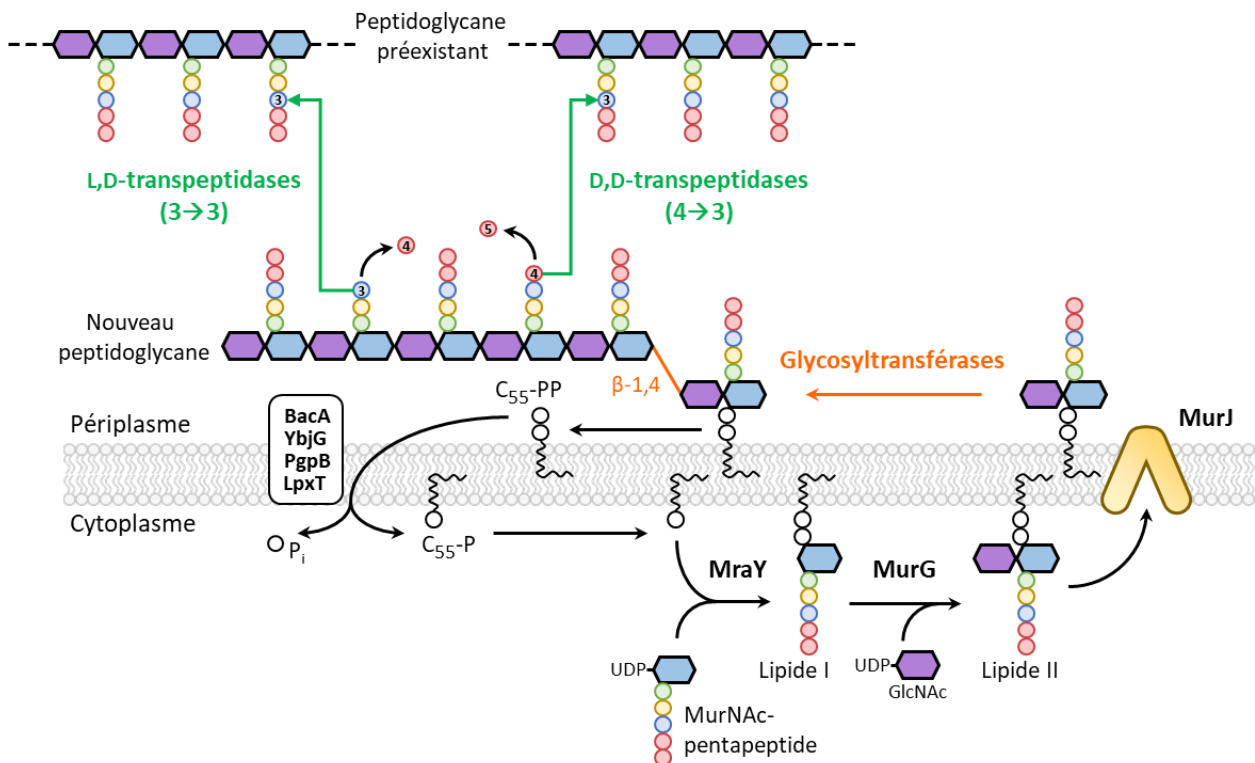


Figure 4. Synthèse périplasmique du peptidoglycane.

Dans le périplasme, les chaînes glycanes sont formées par les glycosyltransférases qui catalysent la formation de liaisons glycosidiques β -1,4 (orange) entre le GlcNAc d'une molécule de Lipide II et le MurNAC d'une chaîne glycanique en cours d'expansion. La formation de cette liaison libère le transporteur C_{55} -PP qui est recyclé en C_{55} -P puis transloqué dans le cytoplasme par les enzymes BacA, YbjG, PgpB et LpxT. Les nouvelles chaînes glycanes sont incorporées au peptidoglycane préexistant par la formation de ponts interpeptidiques reliant un résidu en position 4 à un résidu en position 3 (ponts 4→3 catalysés par les D,D-transpeptidases) ou reliant deux résidus en position 3 (ponts 3→3 catalysés par les L,D-transpeptidases).

Elongasome et divisome. La synthèse du peptidoglycane doit être régulée de façon spatiale et temporelle pour permettre aux bactéries de conserver leur forme et de se diviser au bon moment [voir (Egan, Errington, and Vollmer 2020) pour une revue sur le sujet]. Chez les bacilles comme *E. coli*, il est

communément admis que la synthèse du peptidoglycane est généralement réalisée par deux complexes multiprotéiques qui assurent cette régulation spatio-temporelle : l'élongasome permet la croissance latérale et le divisome permet la formation du septum. Toutes les fonctions présentées (i à iv) ont théoriquement lieu dans l'élongasome et le divisome, mais certaines enzymes fonctionnent indépendamment de ces complexes. L'élongasome et le divisome sont coordonnés par une protéine du cytosquelette, MreB dans l'élongasome (homologue de l'actine) et FtsZ dans le divisome (homologue de la tubuline) (Bi and Lutkenhaus 1991; Jones, Carballido-López, and Errington 2001). Ces deux protéines sont individuellement capables de s'assembler en polymères pour recruter et guider les autres protéines de ces complexes. Les monomères de MreB se polymérisent et dépolymérisent constamment, formant ainsi des filaments avec un mouvement hélicoïdal autour de l'axe polaire de la bactérie (Domínguez-Escobar et al. 2011; Garner et al. 2011; Van Teeffelen et al. 2011). MreB interagit avec les protéines membranaires RodA, PBP2, MreC, MreD et RodZ, ainsi qu'avec MraY et MurG impliquées dans la synthèse des lipides I et II (Kruse, Bork-Jensen, and Gerdes 2005; Mohammadi et al. 2007). MreB se positionne au niveau de la membrane cytoplasmique grâce à une hélice amphiphile en position N-ter et à son interaction avec RodZ (Van Den Ent et al. 2010; Salje et al. 2011). A22 est un inhibiteur de la polymérisation de MreB, ce qui en fait une molécule utilisée dans de nombreuses études pour comprendre le fonctionnement de l'élongasome (Bean et al. 2009). Les monomères de FtsZ se polymérisent et se dépolymérisent en filaments formant un anneau au centre de la bactérie (l'anneau Z, ou « Z-ring » en anglais). La formation de l'anneau Z est finement positionnée au centre de la bactérie par les protéines oscillatoires MinCDE et régulée par de nombreuses protéines [voir (den Blaauwen, Hamoen, and Levin 2017) pour une revue sur le divisome]. Les filaments de FtsZ interagissent dans un premier temps avec les protéines FtsAEX, ZipA et ZapABC, qui permettent de stabiliser l'anneau Z, ainsi qu'avec FtsK qui permet notamment la translocation des chromosomes aux cellules filles. Dans un second temps, l'anneau Z recrute des protéines impliquées dans la régulation (FtsQLBN) et la synthèse (FtsW, PBP3 et PBP1b) du peptidoglycane. Le système Tol-Pal (présenté au chapitre 1.3) assure l'invagination de la membrane externe au fur et à mesure de la formation du septum et de la constriction de l'anneau Z (Gerding et al. 2007).

Polymérisation des chaînes glycanes. Dans le feuillet externe de la membrane interne, le lipide II est utilisé comme substrat par les glycosyltransférases pour alimenter la croissance des chaînes glycanes du peptidoglycane. Une fois que le disaccharide-pentapeptide d'une molécule de lipide II est ajoutée à une chaîne glycane, le C₅₅-PP restant est déphosphorylé par BacA, YbjG, PgpB et LpxT, puis le C₅₅-P est recyclé dans le feuillet interne de la membrane interne pour pouvoir être utilisé par MraY. La bacitracine, un

polypeptide non ribosomique, se fixe au C₅₅-PP périplasmique et bloque sa déphosphorylation, limitant ainsi la quantité de transporteur lipidique disponible (Stone and Strominger 1971).

Chez *E. coli*, il existe six glycosyltransférases appartenant à deux familles d'enzymes non apparentées : les glycosyltransférases 51 (GT51) et les SEDS.

Glycosyltransférases 51 (GT51). Chez *E. coli*, il existe quatre GT51 : la glycosyltransférase monofonctionnelle MtgA et les trois PBP bifonctionnelles de classe A (aPBP ; PBP1a, PBP1b et PBP1c) qui possèdent également un module transpeptidase (Di Berardino et al. 1996; Goffin and Ghuyesen 1998). Les GT51 possèdent 5 motifs signatures avec un résidu Glu catalytique présent dans le premier motif (Coutinho et al. 2003). Les GT51 bifonctionnelles ont été considérées pendant longtemps comme les principales glycosyltransférases car les GT51 monofonctionnelles sont peu conservées et ne sont pas essentielles dans la plupart des bactéries (Reed et al. 2011; Schiffer and Höltje 1999). Les GT51 ont deux sites de fixation à leurs substrats, l'un pour le donneur et l'autre pour l'accepteur (Lovering et al. 2007). Les GT51 catalysent la formation d'une liaison glycosidique β -1,4 entre les carbones C1 du MurNAc à l'extrémité réductrice d'une chaîne glycane croissante liée au C₅₅-PP (donneur) et le carbone C4 du GlcNAc d'une molécule de lipide II (accepteur) (Perlstein et al. 2007). La chaîne glycane en cours de croissance dans le site donneur est transférée sur le lipide II du site accepteur. La chaîne glycane additionnée d'une nouvelle sous-unité disaccharide-pentapeptide est alors déplacée dans le site donneur ce qui libère le C₅₅-PP qui s'y trouve et permet un nouveau cycle de croissance de la chaîne glycane. La moénomycine, un analogue structurale d'une chaîne glycane en cours d'expansion, se fixe dans le site donneur des GT51 et inhibe leur activité glycosyltransférase (Heaslet et al. 2009; Ostash and Walker 2010).

Glycosyltransférases SEDS. Jusqu'à récemment, la communauté scientifique pensait que les aPBP étaient les principales glycosyltransférases (Denome et al. 1999). Cette idée était néanmoins contestée chez *Bacillus subtilis* et *Enterococcus faecalis* car contrairement à *E. coli* la délétion de toutes les aPBP n'est pas létale et confère même la résistance à la moénomycine (Arbeloa et al. 2004; McPherson and Popham 2003). En 2016, les laboratoires de David Z. Rudner et Thomas G. Bernhardt ont montré que la SEDS RodA était la principale glycosyltransférase de l'élongasome (Cho et al. 2016; Meeske et al. 2016). La surexpression de RodA atténue les défauts de croissance de mutants déficients en aPBP de *B. subtilis*. En purifiant RodA, les auteurs ont également montré une activité glycosyltransférase *in vitro* qui n'était pas inhibée par la moénomycine. Les auteurs ont proposé par synténie et par homologie de séquence et de structure avec RodA que la SEDS FtsW était la glycosyltransférase du divisome. Cette proposition était également soutenue par une analogie phénotypique entre la déplétion de RodA qui induit la formation de

cellules sphériques et la déplétion de FtsW qui induit une filamentation des cellules (Gamba, Hamoen, and Daniel 2016; Henriques et al. 1998). Des études ont par la suite confirmé les résultats obtenus avec RodA et démontré l'activité glycosyltransférase de FtsW (Emami et al. 2017; Taguchi et al. 2019). Le mécanisme glycosyltransférase des SEDS est similaire à celui des GT51, avec une chaîne glycanique croissante qui sert de donneur et un lipide II qui sert d'accepteur (Welsh et al. 2019). Cependant, les structures des SEDS et des GT51 sont différentes (Heaslet et al. 2009; Huang et al. 2012; Ovchinnikov et al. 2015; Sjodt et al. 2018). La SEDS RodA de *Thermus thermophilus* est une protéine intégrale de membrane qui possède dix segments transmembranaires avec des longues boucles périplasmiques et des courtes boucles cytoplasmiques, alors que la GT51 monofonctionnelle MgtA de *Staphylococcus aureus* est périplasmique et ancrée à la membrane cytoplasmique par une hélice N-ter (Figure 5). RodA et FtsW interagissent et fonctionnent en couplage dans l'élongasome et le divisome avec leur PBP de classe B (bPBP) respective, la PBP2 et la PBP3 (Leclercq et al. 2017; Sjodt et al. 2018). Les activités de RodA et de FtsW dépendent de leur interaction avec ces bPBP ; l'interaction de RodA avec la PBP2 induit un changement de conformation de RodA qui ouvre suffisamment sa cavité pour pouvoir y accueillir une molécule de lipide II (Sjodt et al. 2020; Taguchi et al. 2019).

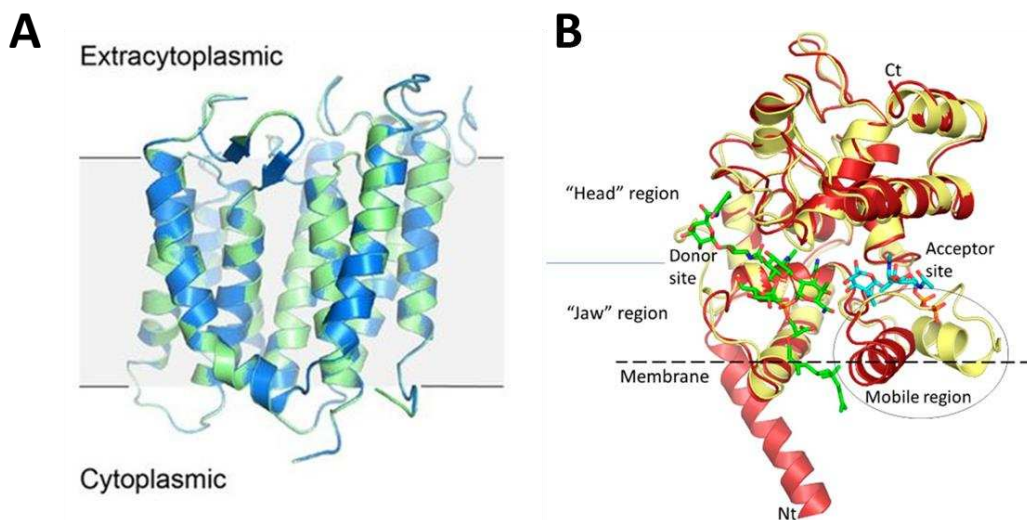


Figure 5. Structures des glycosyltransférases SEDS RodA de *Thermus thermophilus* et GT51 monofonctionnelle MgtA de *Staphylococcus aureus*.

(A) Superposition de la structure de RodA (vert) et de RodA D255A (bleu) (respectivement PDB 6BAR et 6BAS). RodA est une protéine intégrale de membrane. Figure provenant de la référence (Sjodt et al. 2018). (B) Superposition de deux structures de MgtA (PDB 3VMR en jaune et PDB 3HZS en rouge). L'inhibiteur moénomycine (vert) et un analogue du lipide II (bleu) sont respectivement représentés en bâtonnets dans les sites donneur et accepteur. La protéine est ancrée dans la membrane cytoplasmique par une hélice N-ter. Figure provenant de la référence (Sauvage and Terrak 2016).

Réticulation du peptidoglycane. Une fois les chaînes glycanes polymérisées par les glycosyltransférases GT51 ou SEDS, les transpeptidases catalysent la formation des ponts interpeptidiques pour relier les chaînes glycanes entre elles et ainsi réticuler le peptidoglycane. La plupart des bactéries contiennent une majorité de ponts de type 4→3 (Schleifer and Kandler 1972). La formation des ponts 4→3 est catalysée par les D,D-transpeptidases qui appartiennent à la famille des PBP. Ces enzymes relient le D-Ala⁴ d'une tige pentapeptide donneuse à la chaîne latérale du résidu en position 3 d'une tige peptidique accepteuse (DAP³ chez *E. coli*). L'ATP étant une molécule absente du périplasme, l'énergie de liaison nécessaire à la formation d'un pont 4→3 provient de la coupure de la liaison D-Ala⁴-D-Ala⁵ de la tige pentapeptide donneuse (spécificité D,D) (Terrak et al. 1999). Par conséquent, le substrat donneur des D,D-transpeptidases est obligatoirement une tige pentapeptide, alors que le substrat accepteur peut être une tige penta, tétra ou tripeptide, voir un simple acide aminé. Le large spectre d'accepteur possible est d'ailleurs utile pour marquer le peptidoglycane de cellules vivantes avec des acides aminés de conformation D fluorescents (Kuru et al. 2012). Les PBP seront décrites au chapitre 2.2. Les antibiotiques de la famille des β-lactamines, comme la pénicilline, inhibent directement l'ensemble des protéines appartenant à la famille des PBP (d'où la désignation de « Penicillin-Binding Proteins ») et donc les D,D-transpeptidases qui appartiennent à cette famille (Suginaka, Blumberg, and Strominger 1972; Yocum et al. 1979). Ces antibiotiques seront détaillés dans le chapitre 2.3.

Il existe dans de nombreuses bactéries un autre type de pont, les ponts de type 3→3. Ces ponts sont en général minoritaires chez *E. coli* et ne représentent que 5% du total des mucopeptides en phase exponentielle de croissance (Pisabarro, De Pedro, and Vazquez 1985). Néanmoins, les ponts 3→3 peuvent être majoritaires chez certaines espèces (comme les mycobactéries ou *Clostridium difficile*) et constituer jusqu'à 80% du total des ponts (Lavollay et al. 2008, 2011; Peltier et al. 2011). La formation de ces ponts est catalysée par les L,D-transpeptidases (LDT), qui permettent de relier les résidus en position 3 d'une tige tétrapeptide donneuse à la chaîne latérale du résidu en position 3 d'une tige peptidique accepteuse (Mainardi et al. 2005). Les LDT ne sont pas apparentées aux D,D-transpeptidases de la famille des PBP. L'énergie nécessaire à la formation d'un pont 3→3 provient de la coupure de la liaison DAP³-D-Ala⁴ de la tige tétrapeptide donneuse (spécificité L,D). La formation d'une tige tétrapeptide, qui sert de substrat donneur des LDTs, est par conséquent nécessaire à la formation des ponts 3→3. Les tiges tétrapeptides peuvent être formées (i) par l'hydrolyse d'un pont de type 4→3 par une endopeptidase ou (ii) par l'hydrolyse de la liaison D-Ala⁴-D-Ala⁵ d'une tige pentapeptide par une D,D-carboxypeptidase. Comme pour les D,D-transpeptidases, la tige accepteuse des LDT peut être une tige penta, tétra ou tripeptide. Contrairement aux D,D-transpeptidases, les LDT ne sont pas ou peu inhibées par la majorité des β-

lactamines . Seules les β -lactamines appartenant à la classe des carbapénèmes sont des inhibiteurs efficaces de ces enzymes (Triboulet et al. 2013). Les LDT sont également capable de remplacer l'acide aminé en position quatre d'une tige tetrapeptide. Cette propriété a été utilisée en remplaçant la D-Ala⁴ par des sondes fluorescentes dérivées d'acide aminés de conformation D pour localiser l'activité des LDTs *in vivo* (Silva et al. 2018). L'analyse du peptidoglycane de *E. coli* cultivé en milieu riche révèle souvent la présence LDT-dépendante de tiges tetrapeptides avec la D-Ala⁴ substituée par une Gly⁴. Le rôle des L,D-transpeptidases sera décrit au chapitre 2.5.

2.2 Les Protéines de Liaisons à la Pénicilline

Les bactéries possèdent de nombreuses Protéines de Liaisons à la Pénicilline, ou PBP (pour « Penicillin-Binding Proteins » en anglais). Les PBP ont été identifiées grâce à leur capacité à se lier aux antibiotiques de la famille des β -lactamines (Tipper and Strominger 1965; Wise and Park 1965). Les PBP sont généralement classées en deux grands groupes : les PBP de haut poids moléculaire et les PBP de bas poids moléculaires. Les PBP de haut poids moléculaires, qui comprennent les PBP de classe A et B (aPBP et bPBP), sont des PBP transmembranaires qui possèdent plusieurs modules et qui sont directement impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. Les PBP de bas poids moléculaires, souvent regroupées sous le terme PBP de classe C (cPBP), sont des hydrolases qui participent à la maturation du peptidoglycane. Historiquement, pour chaque espèce, les PBP ont été identifiées en SDS-PAGE grâce à des β -lactamines radiomarquées, puis numérotées par ordre décroissant de taille (Spratt 1975). Ceci peut malheureusement porter à confusion, car la numérotation des PBP peut changer complètement en passant d'un organisme à un autre. Par exemple, la PBP1a, la PBP2 et la PBP3 de *E. coli* sont respectivement les homologues de la PBP2, la PBP3 et la PBP1 chez *S. aureus* [voir (Sauvage et al. 2008) pour une revue].

Mécanisme catalytique. Le site catalytique des PBP est caractérisé par 9 résidus d'acides aminés très conservés. Le motif 1 (SXXK) dont fait partie la sérine catalytique, le motif 2 (SXN) et le motif 3 [KTG(T/S)] forment le site catalytique des PBP (Goffin and Ghuysen 1998). Les PBP réalisent leur fonction par un mécanisme catalytique à deux étapes (Figure 6). La première étape, commune à toutes les PBP, est l'attaque nucléophile de la sérine catalytique de la PBP sur le carbone du groupement carbonyle du D-Ala⁴ d'une tige pentapeptide donneuse. Cette attaque nucléophile libère le D-Ala⁵ de la tige peptidique et forme une liaison ester entre le D-Ala⁴ de la tige peptidique donneuse et la sérine catalytique de l'enzyme (acyl-enzyme). La seconde étape qui diffère en fonction des PBP, est la formation d'un pont interpeptidique (D,D-transpeptidation ; aPBP et bPBP) ou l'hydrolyse de l'acyl-enzyme (D,D-

carboxypeptidation ; cPBP). Dans le cas de la D,D-transpeptidation, la liaison ester est attaquée par le groupement amine du résidu en position 3 d'une tige peptidique accepteuse, ce qui libère l'enzyme et entraîne la formation d'un pont interpeptidique de type 4→3 reliant le D-Ala⁴ du donneur au résidu en position 3 de l'accepteur (DAP³ chez *E. coli*). Dans le cas de la D,D-carboxypeptidation, la liaison ester de l'acyl-enzyme est hydrolysée par une molécule d'eau, ce qui libère l'enzyme et la tige tetrapeptide.

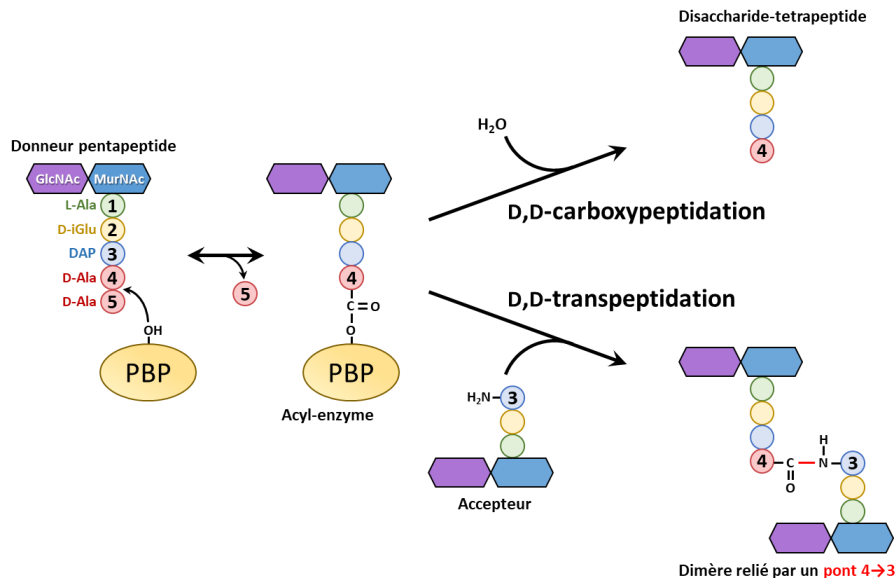


Figure 6. Réactions de D,D-carboxypeptidation et D,D-transpeptidation catalysées par les PBP.

L'attaque nucléophile de la sérine catalytique de la PBP sur la liaison amide reliant le D-Ala⁴ au D-Ala⁵ d'une tige pentapeptide donneuse entraîne la formation d'un acyl-enzyme reliant la sérine catalytique de la PBP au D-Ala⁴ de la tige donneuse par une liaison ester, libérant le D-Ala⁵. Une molécule d'eau peut attaquer la liaison ester et libérer l'enzyme et la tige tetrapeptide (D,D-carboxypeptidation). Le groupement amine du résidu en position 3 d'une tige accepteuse peut attaquer la liaison ester et former un dimère relié par un pont de type 4→3 (D,D-transpeptidation).

E. coli possède douze PBP : trois PBP de classe A (PBP1a, PBP1b et PBP1c, encodées respectivement par les gènes *mrcA*, *mrcB* et *pbpC*), deux PBP de classe B (PBP2 et PBP3, encodées respectivement par les gènes *mrdA* et *ftsI*) et sept PBP de classe C (PBP4, PBP4b, PBP5, PBP6a, PBP6b, PBP7 et AmpH, encodées respectivement par les gènes *dacB*, *yfeW*, *dacA*, *dacC*, *dacD*, *pbpG* et *ampH*).

PBP de classe A. Les trois PBP de classe A (aPBP) de *E. coli* sont des enzymes bifonctionnelles qui possèdent une activité glycosyltransférase et D,D-transpeptidase. Le domaine N-ter transmembranaire de transglycosylation (GT51) est relié au domaine C-ter de D,D-transpeptidation par une attache et un domaine régulateur qui permet l'interaction avec des lipoprotéines de la membrane externe (domaine ODD pour la PBP1a et UB2H pour la PBP1b) (Figure 7). Les fonctions des PBP1a et PBP1b sont partiellement redondantes car une seule des deux enzymes est suffisante pour soutenir la croissance (Yousif, Broome-

Smith, and Spratt 1985). La fonction de PBP1c est encore inconnue et semble distincte de celles des PBP1a et PBP1b (Schiffer and Höltje 1999). Les doubles mutants *mrcA pbpC* ou *mrcB pbpC* sont viables et la surproduction de PBP1c ne permet pas la croissance d'un double mutant *mrcA mrcB* (Denome et al. 1999). De plus, seule l'activité glycosyltransférase de la PBP1c a été démontrée expérimentalement et la plupart des β -lactamines testées ne se fixent pas à son domaine D,D-transpeptidase, ce qui suggère que la PBP1c est uniquement une glycosyltransférase. Par des expériences de létalité conditionnelle avec des doubles mutants *mrcA lpoB* ou *mrcB lpoA*, deux études indépendantes ont réussi à identifier les lipoprotéines régulatrices de PBP1a et PBP1b (Paradis-Bleau et al. 2010; Typas et al. 2010). PBP1a et PBP1b sont respectivement activées lorsque leur domaine régulateur entre en contact avec les lipoprotéines associées LpoA et LpoB. L'activité D,D-transpeptidase de PBP1a et PBP1b est couplée à leur activité glycosyltransférase, mais l'inverse n'est pas vraie. Cela signifie que l'inactivation du domaine D,D-transpeptidase des aPBP entraîne une synthèse de chaînes glycanes non reliées par des ponts, alors que l'inactivation du domaine glycosyltransférase inactive complètement l'enzyme (Sung et al. 2009; Terrak et al. 1999). Des expériences de croissance menées dans des conditions de stress, comme la présence de β -lactamines, de lysozyme, ou à des concentrations de pH variables, ont montré une redondance partielle entre les couples PBP1a-LpoA et PBP1b-LpoB (Garcia del Portillo et al. 1990; Mueller et al. 2019; Ranjit, Jorgenson, and Young 2017). Pendant longtemps PBP1a et PBP1b étaient respectivement considérées comme les composants principaux de l'élongasome et du divisome (Typas et al. 2011). Des expériences *in vivo* de traçage de molécule unique de PBP1a ont cependant démontré l'absence de mouvement hélicoïdale de PBP1a, rejetant l'hypothèse qu'elle puisse intervenir exclusivement dans l'élongasome (Cho et al. 2016). PBP1a montre un déplacement bimodal qui consiste en des mouvements rapides de diffusion à travers la membrane séparés par des pauses. Les auteurs suggèrent que PBP1a diffuse à travers la membrane jusqu'à trouver une ouverture dans la couche de peptidoglycane, ce qui lui permet d'interagir avec LpoA et de combler cette ouverture. Dans le sens de cette hypothèse, une étude a montré que la surexpression d'endopeptidase, ce qui participe théoriquement à la formation d'ouvertures dans la couche de peptidoglycane, entraîne une augmentation de la synthèse du peptidoglycane par les aPBP (Lai, Cho, and Bernhardt 2017). Les auteurs d'une autre étude ont également montré le même schéma de déplacement pour PBP1b et proposent que les aPBP ont un rôle de réparation du peptidoglycane (Vigouroux et al. 2020). Néanmoins, le rôle de PBP1b dans la formation du septum n'est pas à exclure car il y a un fort enrichissement de PBP1b au divisome et la protéine régulatrice CpoB coordonne l'activité D,D-transpeptidase de PBP1b avec l'invagination de la membrane externe par le système Tol-Pal (Bertsche et al. 2006; Gray et al. 2015).

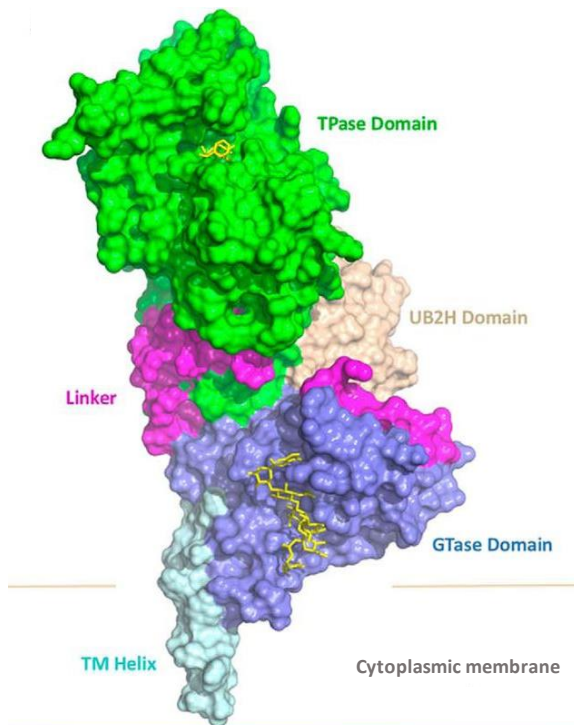


Figure 7. Structure de la surface moléculaire la PBP1b de *Escherichia coli*.

L'hélice transmembranaire (TM Helix), le domaine glycosyltransférase GT51 (GTase Domain), l'attache (Linker), le domaine UB2H (UB2H Domain) et le domaine D,D-transpeptidase (TPase Domain) sont respectivement colorés en cyan, bleu, rose, beige et vert. La moénomycine et l'ampicilline, qui inhibent respectivement les domaines GTase et TPase sont représentées par des bâtonnets jaunes. Figure provenant de la référence (King et al. 2017).

PBP de classe B. Les deux PBP de classe B (bPBP) de *E. coli* sont essentielles à la croissance. Ce sont des enzymes monofonctionnelles qui possèdent une activité D,D-transpeptidase. Leur domaine C-ter de D,D-transpeptidation est semblable à celui des aPBP. Leur domaine N-ter transmembranaire ne possède cependant pas d'activité catalytique et est probablement impliqué dans d'autres fonctions. Des études structurales suggèrent que le domaine N-ter (également nommé domaine de morphogénèse) pourrait servir de piédestal au domaine C-ter pour atteindre la couche de peptidoglycane (Sauvage et al. 2014). Le domaine N-ter intervient également dans des interactions protéines-protéines. Par exemple, l'interaction du domaine N-ter de la PBP2 avec la protéine de l'élongasome MreC stimule l'activité glycosyltransférase de RodA (Contreras-Martel et al. 2017; Rohs et al. 2018). De même, le domaine N-ter de la PBP3 de *E. coli* lui permet de se localiser au divisome et d'y recruter la protéine FtsN qui stimule l'activité glycosyltransférase de FtsW et PBP1b (Boes et al. 2019; Wissel and Weiss 2004). Les PBP2 et PBP3 de *E. coli* fonctionnent en s'associant respectivement avec les glycosyltransférases SEDS RodA et FtsW dans l'élongasome et dans le divisome (chapitre 2.1.3) (Cho et al. 2016; Spratt 1975; Taguchi et al. 2019). L'inhibition respective de la PBP2 ou de la PBP3 entraîne le même phénotype que l'inactivation de RodA

ou de FtsW, c'est-à-dire la formation de cellules sphériques ou de filaments. Chez d'autres espèces et notamment chez les monodermes, des bPBP possédant une faible affinité pour les β -lactamines sont souvent impliquées dans la résistance à cette famille d'antibiotique (PBP2a de *Staphylococcus aureus* ou PBP5 de *Enterococcus faecium* par exemple) (Fontana et al. 1994; Hartman and Tomasz 1984).

Un changement de paradigme a récemment eu lieu dans le rôle des différents couples glycosyltransférase-D,D-transpeptidase dans la synthèse du peptidoglycane. Avant la découverte des couples SEDS-bPBP, les aPBP étaient considérées comme les principales enzymes contribuant à la synthèse du peptidoglycane. Les modèles les plus récents suggèrent cependant que les couples SEDS-bPBP de l'élongasome et du divisome sont les principales machineries de synthèse du peptidoglycane, permettant de construire une structure d'échafaudage (activité de « scaffolding » en anglais) dont les parties manquantes pour former un peptidoglycane complet sont comblées par les aPBP qui fonctionnent de façon autonome (activité de « gap-filling » en anglais) (Figure 8) (Cho et al. 2016; Vigouroux et al. 2020) [voir (Straume et al. 2021) pour une revue sur le sujet]. Cette idée est d'autant plus soutenue par le fait que la quasi-totalité des phyla bactériens possède un couple SEDS-bPBP alors que les aPBP y sont parfois absentes (Meeske et al. 2016).

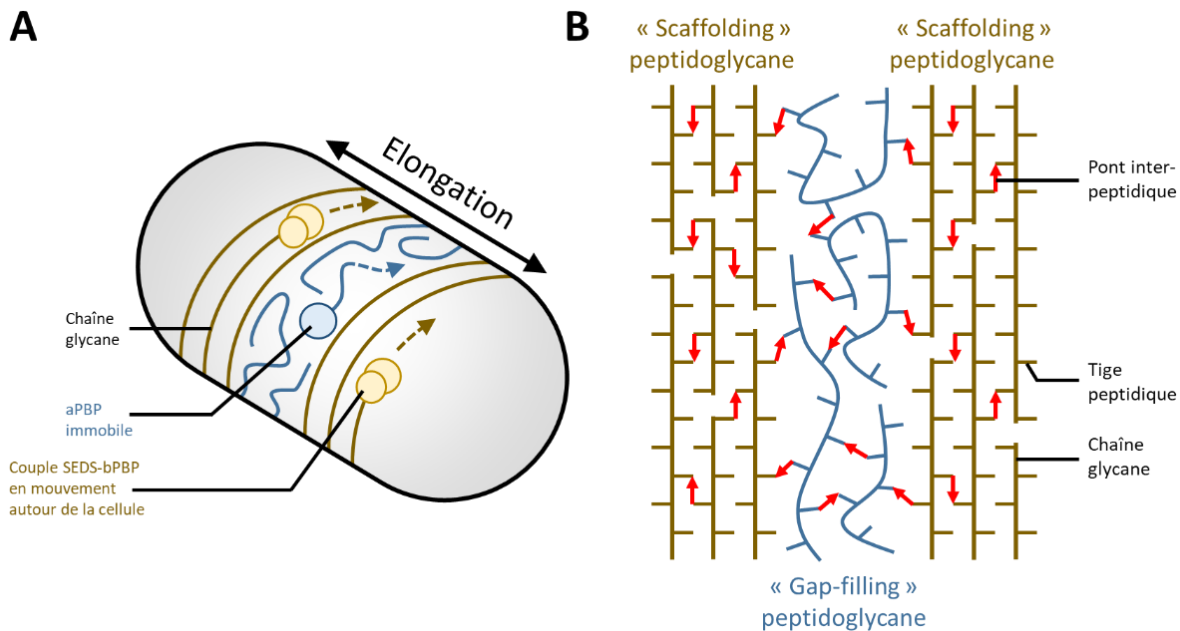


Figure 8. Modèle proposé d'élongation par les aPBP et les couples SEDS-bPBP.

(A) La synthèse du peptidoglycane se fait par les couples SEDS-bPBP (jaune) qui se déplacent avec un mouvement hélicoïdal autour de l'axe polaire de la bactérie. L'espace entre les chaînes glycanes synthétisées par les SEDS-bPBP est comblé par les aPBP immobiles. (B) Dans ce modèle, les chaînes glycanes jaunes sont orientées grâce au mouvement hélicoïdal des SEDS-bPBP, alors que les chaînes glycanes bleues sont insérées par les aPBP de façon anarchique.

PBP de classe C. Les sept PBP de classe C (cPBP) de *E. coli* sont impliquées dans des processus de remodelage et de maturation du peptidoglycane. Elles sont toutes accessoires et leurs fonctions seront détaillées dans le chapitre 2.4. Les cPBP sont des D,D-carboxypeptidases qui hydrolysent la liaison D-Ala⁴-D-Ala⁵ d'une tige peptidique et/ou des endopeptidases qui hydrolysent les ponts interpeptidiques de type 4→3.

La PBP4b (YfeW), la PBP5 (DacA), la PBP6a (DacC) et la PBP6b (DacD) sont des D,D-carboxypeptidases monofonctionnelles (Amanuma and Strominger 1980; Baquero et al. 1996; Spratt and Strominger 1976; Vega and Ayala 2006). La PBP4b est totalement dispensable, il n'y a aucun phénotype associé à son absence et son activité D,D-carboxypeptidase est faible (Vega and Ayala 2006). La PBP5 a la particularité d'être la PBP la plus produite chez *E. coli* ce qui en fait la D,D-carboxypeptidase majoritaire (Matsushashi et al. 1979; Spratt and Strominger 1976). PBP5 a également la particularité d'être la seule PBP de *E. coli* à être très peu inhibée par la majorité des β-lactamines (Kocaoglu and Carlson 2015). La PBP6a est fortement produite en phase stationnaire mais son rôle physiologique est encore incertain (Buchanan and Sowell 1982; Van der Linden et al. 1992). PBP5, PBP6a et PBP6b sont ancrées à la membrane cytoplasmique par une hélice amphiphile, qui est nécessaire à l'activité *in vitro* de PBP5 (Nelson and Young 2001; o'Daniel et al. 2010).

La PBP7 est une endopeptidase 4→3 monofonctionnelle (Romeis and Höltje 1994). La protéase périplasmique OmpT coupe la PBP7 lorsque les cellules d'*E. coli* sont lysées ou lorsque les membranes sont perturbées par congélation-décongélation (Henderson, Dombrosky, and Young 1994). La version tronquée de PBP7, qui relève d'un artefact méthodologique, a été désignée dans la littérature comme étant la PBP8. La PBP7 est soluble et peu attachée à la membrane cytoplasmique (Barbas et al. 1986).

La PBP4 et AmpH sont bifonctionnelles et possèdent une activité D,D-carboxypeptidase et une activité endopeptidase 4→3 (Gonzalez-Leiza, de Pedro, and Ayala 2011; Korat, Mottl, and Keck 1991). La PBP4 est majoritairement soluble alors que AmpH est lié à la membrane cytoplasmique.

2.3 Les β-lactamines

Les antibiotiques les plus couramment utilisés en thérapeutiques appartiennent à la famille des β-lactamines. Ce succès est dû à leur très large spectre d'action ainsi qu'à leur propriétés pharmacocinétiques (disponibilité orale, bonne diffusion tissulaire, peu de toxicité) (Lima et al. 2020). La première β-lactamine identifiée, la pénicilline G, provient des champignons unicellulaires du genre

Penicillium et a été découverte par Alexander Fleming en 1928 (Kong, Schneper, and Mathee 2010). Il aura fallu attendre le début des années 1940 pour arriver à purifier cette molécule en quantité suffisante pour pouvoir traiter des patients et entrer dans l'ère des antibiotiques. Le mode d'action et les cibles des β -lactamines, les PBP, auront ensuite été découverts dans les décennies suivantes (Park and Strominger 1957; Tipper and Strominger 1965; Wise and Park 1965). De nombreuses molécules de β -lactamines appartenant à différentes classes ont ensuite été développées et optimisées pour traiter les infections bactériennes. Aujourd'hui, en plus de leur énorme contribution au traitement des infections bactériennes, les β -lactamines sont également un formidable outil de recherche pour comprendre la synthèse de la paroi bactérienne et pour décrypter les différents mécanismes de réponse aux stress de l'enveloppe.

Les classes des β -lactamines. Les β -lactamines présentent toutes une structure commune : un cycle azétidine-2-one (hétérocycle azoté à quatre atomes substitué d'un groupement carbonyle, nommé simplement cycle ou noyau β -lactame). Il existe plusieurs classes de β -lactamines en fonction de la nature du cycle accolé au noyau β -lactame. Les principales familles de β -lactamines sont les pénames, les céphèmes, les carbapénèmes et les monobactames (Figure 9). Il existe également des inhibiteurs de β -lactamases (les enzymes qui dégradent les β -lactamines) qui appartiennent à des familles différentes de β -lactamines [voir (Bush and Bradford 2016) pour une revue sur les β -lactamines]. La plupart des β -lactamines ont été obtenues par hémisynthèse, en modifiant des chaînes latérales, pour améliorer la disponibilité orale, la stabilité ou encore le spectre d'activité (Bush and Bradford 2016).

Les pénames, ou pénicillines, ont été les premières β -lactamines identifiées. Ce sont des molécules qui proviennent initialement des fungi unicellulaires du genre *Penicillium*. Le noyau péname des pénicillines est constitué d'un cycle thiazolidine fusionné au cycle β -lactame (Dalhoff and Thomson 2003). Ce cycle saturé est composé de cinq atomes dont un atome de soufre en position 4. L'ampicilline, l'amoxicilline et le mecillinam sont trois représentants des pénicillines obtenus par hémisynthèse.

Les céphèmes, ou céphalosporines, diffèrent des pénicillines par la présence d'un cycle dihydrothiazine fusionné au cycle β -lactame (Dalhoff and Thomson 2003). Ce cycle mono-insaturé en position C2-C3 est composé de six atomes dont un atome de soufre en position 5. Les céphalosporines sont les β -lactamines les plus abondantes et les plus utilisées en thérapeutique (Bush and Bradford 2016). Les céphalosporines sont classées en cinq générations en fonction de leur spectre d'activité et de leur date de commercialisation. Le ceftriaxone et le céf sulodine sont deux représentants des céphalosporines de 3^{ème} génération obtenus par hémisynthèse.

Les carbapénèmes diffèrent des pénames et des céphèmes par la présence d'un cycle pyrroline (ou azoline) fusionné au cycle β -lactame (Papp-Wallace et al. 2011). Ce cycle mono-insaturé en position C2-C3 est composé de cinq atomes et est dépourvu de soufre, contrairement aux pénames et aux céphèmes. La liaison entre le C5 et le C6 des carbapénèmes (dans le noyau β -lactame) est en configuration *trans* alors que celle des pénames et des céphèmes est en configuration *cis*. Les carbapénèmes présentent des concentrations minimales inhibitrices (CMI) extrêmement basse vis-à-vis de la majorité des bactéries. Leur très large spectre, leur extrême efficacité à traiter des infections bactériennes et leur injection par intraveineuse en font des antibiotiques de dernier recours. L'imipénème et le méropénème sont des représentants des carbapénèmes obtenus par hémisynthèse.

Les monobactames sont des β -lactamines particulières car elles possèdent un simple cycle β -lactame (Imada et al. 1981). Leur spectre d'action est plus restreint que les autres β -lactamines (Bush and Bradford 2016). L'aztréoname, obtenu par synthèse totale, est le seul représentant commercialisé des monobactames.

Les β -lactamines possèdent des spectres d'action variés. Chez *E. coli* par exemple, le méropénème inhibe efficacement la PBP5 mais n'inhibe pas les aPBP, alors que l'ampicilline inhibe efficacement les aPBP mais n'inhibe pas la PBP5 (Curtis et al. 1979; Kocaoglu and Carlson 2015). L'ampicilline, le ceftriaxone et le méropénème sont typiquement des β -lactamines à large spectre, mais il existe certaines β -lactamines à spectre très restreint. Par exemple, toujours chez *E. coli*, le mecillinam inhibe spécifiquement la PBP2 de l'élongasome, l'aztréoname inhibe spécifiquement la PBP3 du divisome, et le céfzulodine inhibe spécifiquement l'activité D,D-transpeptidase des PBP1a et PBP1b. Ces β -lactamines à spectre restreint sont très utilisées en recherche et permettent d'étudier spécifiquement l'élongation, la division et les contributions relatives à la synthèse du peptidoglycane des aPBP et bPBP (Atze et al. 2022; Cho, Uehara, and Bernhardt 2014; Lai et al. 2017; Pazos et al. 2020).

Classe de β -lactamine	Structure	Chaîne(s) latérale(s) d'un représentant
Pénème		Ampicilline R =
Céphème		Ceftriaxone R1 = R2 =
Carbapénème		Imipénème R1 = R2 =
Monobactame		Aztréonam R1 = R2 =

Figure 9. Structures des classes de β -lactamines.

Les structures des quatre classes de β -lactamines les plus communes (pénème, céphème, carbapénème et monobactame) sont présentées avec un représentant de chaque classe.

Mode d'action des β -lactamines. Les β -lactamines sont des inhibiteurs suicides des PBP. Les PBP sont efficacement inhibées par les β -lactamines grâce à la formation d'un acyl-enzyme liant la sérine catalytique des PBP au groupement carbonyle du noyau β -lactame (Park and Strominger 1957; Tipper and Strominger 1965). Contrairement à la formation d'un acyl-enzyme avec une tige peptidique donneuse, la formation de l'acyl-enzyme avec une β -lactamine est stable et permet d'inactiver l'enzyme de façon irréversible. La réactivité des β -lactamines avec les PBP provient en partie de la ressemblance structurelle entre les β -lactamines et l'extrémité D-Ala⁴-D-Ala⁵ des tiges pentapeptides du peptidoglycane (Figure 10). L'inactivation des PBP essentielles par les β -lactamines déplace l'équilibre synthèse-dégradation du peptidoglycane vers la dégradation, ce qui diminue l'intégrité de l'enveloppe bactérienne et mène à la lyse cellulaire (Tomasz 1979; Tomasz and Waks 1975).

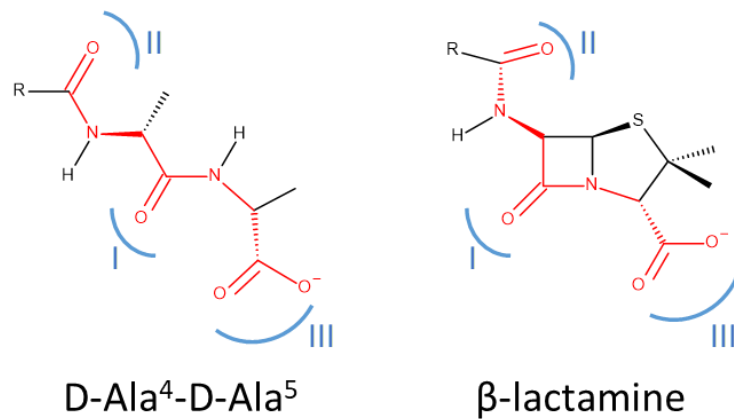


Figure 10. Analogie structurelle entre le substrat des PBP et les β-lactamines.

La structure de l'extrémité D-Ala⁴-D-Ala⁵ d'une tige pentapeptide présente des similarités avec la structure des β-lactamines (rouge) et avec la répartition des électrons aux positions I, II et III (bleu).

En plus d'un déséquilibre synthèse-dégradation du peptidoglycane, l'inactivation des PBP par les β-lactamines entraîne une cascade d'évènements qui peut conduire *in fine* à la mort cellulaire (non-lytique). Cette cascade d'évènement n'est pas totalement comprise et est encore le sujet de nombreuses études. Certaines d'entre elles ont notamment montré que la culture d'*E. coli* avec des concentrations subinhibitrice d'ampicilline entraîne une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de la fréquence de mutation (Gutierrez et al. 2013; Kohanski, DePristo, and Collins 2010). En 2014, l'équipe de Thomas G. Bernhardt a démontré l'existence d'un cycle futile de synthèse et de dégradation du peptidoglycane lorsque les bactéries sont confrontées aux β-lactamines (Cho et al. 2014). Les auteurs de cette étude ont montré que l'inhibition de la PBP2 par le mecillinam entraîne la formation de chaînes glycanes non pontées (médiée par l'activité glycosyltransférase de RodA, qui n'était pas connu en 2014). Ces chaînes glycanes non pontées sont ensuite dégradées par la transglycosylase lytique Slt. Les fragments de peptidoglycane générés par Slt sont recyclés dans le cytoplasme et vont alimenter la synthèse du peptidoglycane, entraînant le cycle futile décrit par les auteurs. En absence de Slt les chaînes glycanes formées par l'élongasome vont être reliées au peptidoglycane préexistant par des ponts de type 3→3 (médiées par les L,D-transpeptidases). Les auteurs ont également montré que ce cycle futile était spécifique dû à l'inactivation des PBP. L'inhibition de la polymérisation de MreB par le A22, qui inactive indirectement l'activité de RodA et de la PBP2, n'entraîne pas de cycle futile seul ou en présence de mecillinam. Les auteurs suggèrent que ce cycle futile est à l'origine de la diminution de la quantité de lipide II observée dans des cellules traitées aux β-lactamines (Kohlrusch and Holtje 1991). Cette hypothèse est en adéquation avec les résultats d'une autre étude qui suggère que l'inactivation du domaine D,D-transpeptidase de la PBP1a par le céf sulodine stimule son activité glycosyltransférase (Banzhaf et al. 2012).

Dans une étude récente, l'équipe de James J. Collins a essayé de comprendre au niveau métabolique la cascade d'événement induite par le mecillinam et le cycle futile (Lobritz et al. 2022). Les auteurs de cette étude ont montré que l'exposition au mecillinam entraînait de très nombreux changements métaboliques. Le mecillinam entraînait (i) une augmentation des produits de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la voie des pentose phosphate, (ii) une augmentation de la respiration, (iii) une augmentation de la quantité d'UDP-GlcNAc, (iv) une augmentation de la synthèse des acides aminés et des protéines, (v) une diminution de la charge énergétique des adénylates et (vi) un dérèglement de l'environnement redox intracellulaire. Les auteurs de cette étude conclut que l'exposition au mecillinam, et par extension le cycle futile, entraîne une demande énergétique très importante qui va carencer les cellules en ATP. La cellule augmente alors la génération d'ATP par la glycolyse, le cycle de Krebs et la respiration. Cette augmentation du métabolisme énergétique entraîne un stress oxydant qui endommage les protéines, ce qui entraîne une augmentation de la synthèse des protéines pour compenser les dégâts. Cette synthèse accrue des protéines vient alors rajouter une demande énergétique supplémentaire, entraînant encore plus de dérèglements métaboliques et *in fine* la mort cellulaire. Ce modèle de mort cellulaire non-lytique proposé est en adéquation avec une étude réalisée sur des bactéries monoderme de forme L (Kawai et al. 2019). Les bactéries de forme L sont des bactéries sans peptidoglycane obtenue par traitement avec du lysozyme et des β -lactamines, et cultivées dans un milieu osmoprotectant. Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane entraîne une augmentation de la glycolyse et de la production de ROS. Les auteurs ont également montré que le traitement de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ou *Listeria monocytogenes* à la pénicilline G et au lysozyme dans un milieu osmoprotectant permettait la formation de bactérie de forme L uniquement si le milieu de culture contenait des sources de carbone stimulant la néoglucogénèse plutôt que la glycolyse. *Enterococcus faecium*, qui ne possède pas de chaîne respiratoire, échappait à la mort cellulaire dépendante de la glycolyse et induite par les β -lactamines.

Toutes ces études montrent que les β -lactamines ont un impact qui va au-delà de la synthèse du peptidoglycane et touchent de nombreux aspects du métabolisme. L'état métabolique des cellules est par conséquent un élément important pour la létalité des β -lactamines. Cette idée est notamment soutenue par le fait que la létalité des β -lactamines est parfaitement corrélée à la vitesse de croissance (A. J. Lee et al. 2018; Tuomanen et al. 1986). Cette notion de métabolisme actif nécessaire à la létalité des β -lactamines est également en adéquation avec l'existence d'interférence des β -lactamines avec le chloramphenicol (un inhibiteur de la synthèse des protéines) chez *Klebsiella pneumoniae* ou avec la bedaquiline (un inhibiteur

de l'ATP synthase) chez *Mycobacterium abscessus* par exemple (Brown and Alford 1984; Lindman and Dick 2019).

Mécanisme de résistance aux β -lactamines. Les bactéries ont développé de nombreux moyens de défense pour résister à l'action des β -lactamines (Figure 11) [voir (Blair et al. 2015) pour une revue sur le sujet]. La première description d'une enzyme capable de dégrader les β -lactamines remonte à 1940, avant leur utilisation en thérapeutique (Abraham and Chain 1940). L'utilisation massive des antibiotiques, à la fois en médecine humaine et en agriculture, entraîne une énorme pression de sélection sur les bactéries. Cette pression de sélection favorise l'apparition de résistance par mutation ou par transfert horizontal de gènes. Plusieurs mécanismes de résistance aux β -lactamines existent et les bactéries résistantes peuvent les accumuler. L'apparition de souches multirésistantes difficiles à traiter amène parfois à des impasses thérapeutiques.

Chez les bactéries didermes comme *E. coli*, les β -lactamines doivent pénétrer la membrane externe pour atteindre les PBP. Les β -lactamines sont des molécules hydrophiles et pénètrent la membrane externe en passant par des porines. Les principales porines de *E. coli* sont OmpF et OmpC, et toutes deux permettent la pénétration des β -lactamines. Des substitutions dans les porines ou la modification du niveau d'expression des gènes codant pour les porines permettent de diminuer la pénétration des β -lactamines (Cohen, McMurry, and Levy 1988; Lavigne et al. 2013; Novais et al. 2012; Tängdén et al. 2013; Ude et al. 2021).

Toujours chez les bactéries didermes, un autre moyen de diminuer la concentration périplasmique des β -lactamines est la production de pompes à efflux [voir (Du et al. 2018) pour une revue]. Les mutations conduisant à une résistance par les pompes à efflux sont généralement situées dans des gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels et entraînent une surproduction des pompes. Les pompes à efflux transportent activement les β -lactamines du périplasma vers le milieu extérieur. Elles peuvent être spécifiques à certains antibiotiques ou avoir un large spectre et conférer de multiples résistances (Vargiu and Nikaido 2012). Les pompes à efflux à large spectre appartiennent à la superfamille RND (pour « Resistance, Nodulation, Cell division » en anglais). Chez *E. coli*, la pompe à efflux à large spectre majoritaire est constituée des trois protéines AcrAB et TolC. AcrB s'assemble en homotrimer dans la membrane interne et s'associe avec la protéine périplasmique AcrA et la protéine de la membrane externe TolC qui forme un canal (Du et al. 2014). Des inhibiteurs des pompes à efflux de la famille RND sont actuellement en développement et pourrait être utilisés en combinaison avec des antibiotiques (Plé et al. 2022).

Le mécanisme de résistance aux β -lactamines le plus couramment rencontré en thérapeutique chez les bactéries didermes est la production d'enzymes capables d'hydrolyser ces antibiotiques, les β -lactamases [voir (Tooke et al. 2019) pour une revue sur les β -lactamases]. En se concentrant dans le périplasma, les β -lactamases sont capables d'hydrolyser les β -lactamines avant qu'elles ne rencontrent leurs cibles. Il existe plusieurs classifications pour les β -lactamases. La classification d'Ambler, la plus couramment utilisée, se base sur la comparaison des séquences protéiques et discrimine les β -lactamases en quatre classes (A, B, C et D) (Ambler 1980). Les β -lactamases de classes A, C et D sont des enzymes qui dégradent les β -lactamines grâce à la formation d'un acyl-enzyme avec leur sérine catalytique. L'acyl-enzyme sera ensuite hydrolysé, libérant l'enzyme et inactivant définitivement l'antibiotique. Les β -lactamases de classe B sont des métallo-enzymes qui utilisent un ion zinc dans leur site actif pour faciliter l'hydrolyse des β -lactamines. Les β -lactamases peuvent également être classées par leur capacité à hydrolyser les pénicillines (pénicillinases), les céphalosporines (céphalosporinases) et/ou les carbapénèmes (carbapénémas) (Bush, Jacoby, and Medeiros 1995). La combinaison de carbapénémas et de céphalosporinases à large spectre (ESBLs pour « Extended-Spectrum β -Lactamases » en anglais, capables d'hydrolyser les céphalosporines et les pénicillines) a conduit à l'émergence d'isolats cliniques résistants à toutes les β -lactamines (Lynch, Clark, and Zhanel 2013). La plupart des *Enterobacteriaceae* comme *E. coli* possède le gène chromosomique *ampC* qui code pour une céphalosporinase de classe C (Jacoby 2009). L'expression de *ampC* peut être induite en réponse à des fragments de peptidoglycane dans le cytoplasme, pouvant indiquer la présence de β -lactamines dans le périplasma. La surexpression de *ampC* en réponse aux β -lactamines nécessite le régulateur transcriptionnel AmpR, absent des souches de laboratoire K-12 de *E. coli*. Des mutations dans le promoteur de *ampC* peuvent également augmenter le niveau d'expression du gène et conférer une résistance aux β -lactamines. Plusieurs inhibiteurs de β -lactamases existent. Les inhibiteurs de 1^{ère} génération comme l'acide clavulanique possèdent un noyau β -lactame et réagissent avec les β -lactamases de classes A, C et D pour former un acyl-enzyme stable qui inactive l'enzyme de façon irréversible. Les inhibiteurs de 2^{nde} génération comme l'avibactam ont un cycle diazabicyclooctane (abrévié en DBO) et fonctionnent d'une façon similaire aux inhibiteurs de 1^{ère} génération, à l'exception que leur inhibition est réversible (Ehmann et al. 2012). Les inhibiteurs de 1^{ère} et 2^{nde} génération ne sont cependant pas capables d'inhiber les métallo- β -lactamases de classe B.

Un mécanisme de résistance souvent rencontré chez les bactéries monodermes est l'expression de PBP de faible affinité pour les β -lactamines. La PBP2a de *Staphylococcus aureus*, la PBP5 de *Enterococcus faecium* et la PBP4 de *Enterococcus faecalis* sont toutes des bPBP de faible affinité qui montrent un niveau d'acylation avec les β -lactamines trois fois plus faible que pour les autres bPBP (Lambert 2005; Zapun,

Contreras-Martel, and Vernet 2008). La surexpression de ces PBP de faible affinité n'est cependant pas suffisante pour conférer la résistance chez les entérocoques, et des substitutions d'acide aminés dans les bPBP sont nécessaires (Klare et al. 1992). La résistance aux β -lactamines par des substitutions dans les PBP est d'ailleurs fréquemment rencontrée. La présence de mutations dans la PBP4 de *Pseudomonas aeruginosa*, dans la PBP1 de *Helicobacter pylori*, dans la PBP1 de *Neisseria gonorrhoeae* et dans d'autres PBP d'autres espèces a déjà été décrite dans la littérature (Bellido et al. 1990; Okamoto et al. 2002; Ropp et al. 2002). En plus de simple ou multiples substitutions dans les PBP, des événements de recombinaisons homologues entre espèces proches peuvent entraîner la formation d'allèle mosaïque codant pour des PBP de faible affinité (Lambert 2005).

Enfin, le dernier mécanisme de résistance aux β -lactamines décrit dans la littérature est le contournement de l'activité D,D-transpeptidase des PBP par l'activité L,D-transpeptidase des LDT (Hugonnet et al. 2016; Mainardi et al. 2000). Ce mécanisme de résistance sera décrit en détail dans le chapitre 2.5.2.

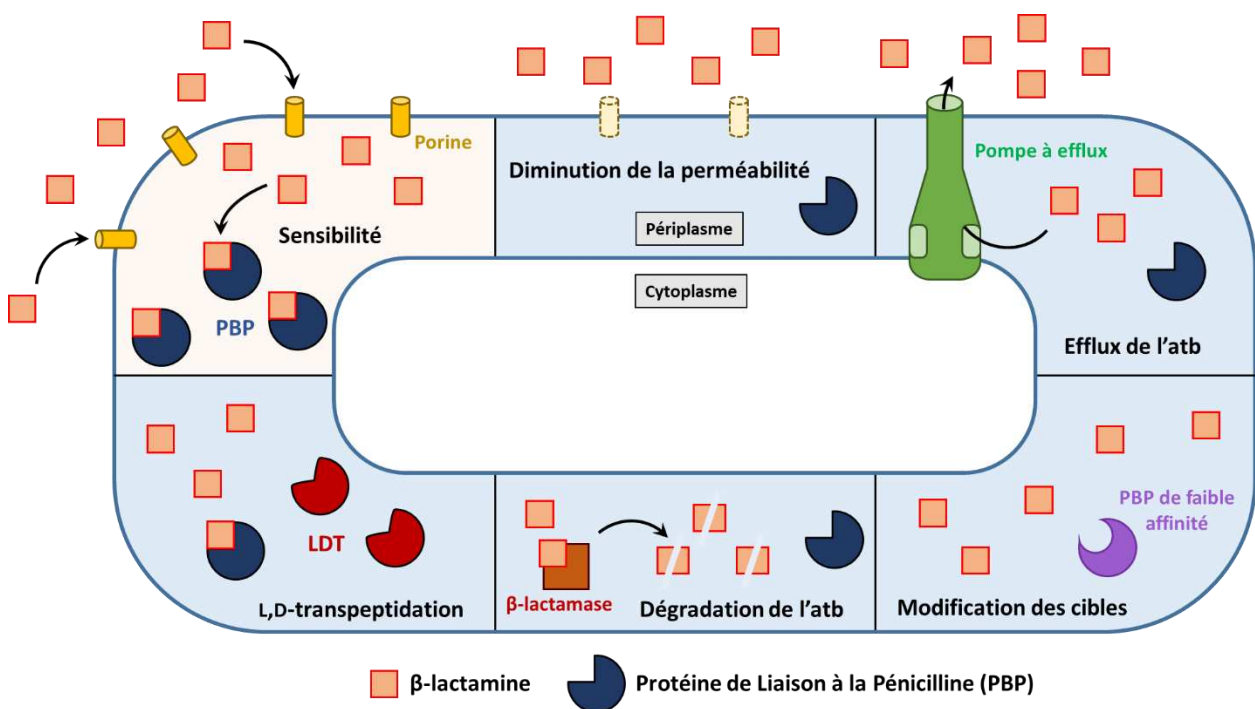


Figure 11. Mécanismes de résistance aux β -lactamines chez les bactéries didermes.

Les β -lactamines pénètrent dans le périplasm en passant par les porines de la membrane externe. Les bactéries sensibles (fond orange) sont tuées à cause de l'inhibition des PBP par les β -lactamines. Confrontées aux antibiotiques (atb), les bactéries peuvent développer des résistances (fond bleu) en diminuant l'expression des porines (diminution de la perméabilité), en produisant des pompes à efflux (efflux de l'antibiotique), en produisant des PBP de faible affinité (modification des cibles), en produisant des β -lactamases qui hydrolysent les β -lactamines (dégradation de l'antibiotique), et en contournant les PBP par l'action des LDTs (L,D-transpeptidation).

2.4 Les hydrolases du peptidoglycane

La première enzyme de dégradation du peptidoglycane identifiée, le lysozyme, a été découverte par Alexander Fleming en 1922 (Fleming 1922). Il s'agit d'une *N*-acétyl-muramidase qui hydrolyse les liaisons β -1,4 entre les MurNAc et les GlcNAc des chaînes glycanes. Cette protéine est produite par de nombreuses espèces d'animaux et leur confère une protection relative contre les bactéries monodermes. De nombreuses autres familles d'enzyme dégradant le peptidoglycane ont ensuite été décrites, et ces enzymes, regroupées sous le terme d'hydrolases, sont nécessaires à la croissance des bactéries.

L'expansion de la surface du peptidoglycane lors de l'élongation et la séparation des cellules filles nécessite la dégradation de matériel préexistant médiée par les hydrolases (Höltje and Heidrich 2001). Sans cette dégradation, le peptidoglycane en expansion ne pourrait croître qu'en épaisseur et le septum ne pourrait pas être dégradé, entraînant la formation de chaînettes. La pression osmotique exercée par le cytoplasme est présente tout au long du cycle cellulaire, par conséquent l'action des hydrolases doit intervenir de façon coordonnée avec la synthèse des nouvelles chaînes glycanes. Les activités des différentes hydrolases doivent être finement régulées pour ne pas entraîner la lyse bactérienne induite par une dégradation incontrôlée du peptidoglycane. Il existe plusieurs familles d'hydrolases avec des enzymes aux fonctions redondantes, classées pour leurs différentes capacités à dégrader une liaison particulière du peptidoglycane. Chez *E. coli*, il existe dans le périplasme quatre groupes d'hydrolases : les transglycosylases lytiques, les amidases, les endopeptidases et les carboxypeptidases (Figure 12). La redondance des hydrolases fait qu'aucune d'entre elles n'est spécifiquement essentielle pour la croissance, et les délétions indépendantes des gènes codant pour les hydrolases n'entraînent en général pas ou peu de différences phénotypiques. L'absence d'activité transglycosylase lytique ou endopeptidase n'est pas compatible avec la croissance de *E. coli*, alors que l'absence d'activité amidase ou carboxypeptidase est tolérée (Denome et al. 1999; Heidrich et al. 2001; Scheurwater and Clarke 2008; Singh et al. 2012; Vollmer 2012). La redondance des différentes hydrolases est frappante et trois éléments de réponse peuvent nous éclairer sur cette redondance. Tout d'abord, certaines d'entre elles peuvent avoir une spécialisation spatio-temporelle et intervenir dans la régulation et la synthèse du peptidoglycane médiées par le divisome, l'élongasome ou les aPBP. Ensuite, certaines hydrolases peuvent être spécialisées pour répondre aux différentes conditions physicochimiques que les bactéries peuvent rencontrer, comme des fluctuations de la température, du pH, de l'osmolarité, de la concentration de certains ions ou encore la présence de molécules toxiques. Enfin, certaines hydrolases peuvent être spécifiquement requises pour

des processus cellulaires spécifiques tel que l'incorporation de complexes multiprotéiques à travers la couche de peptidoglycane.

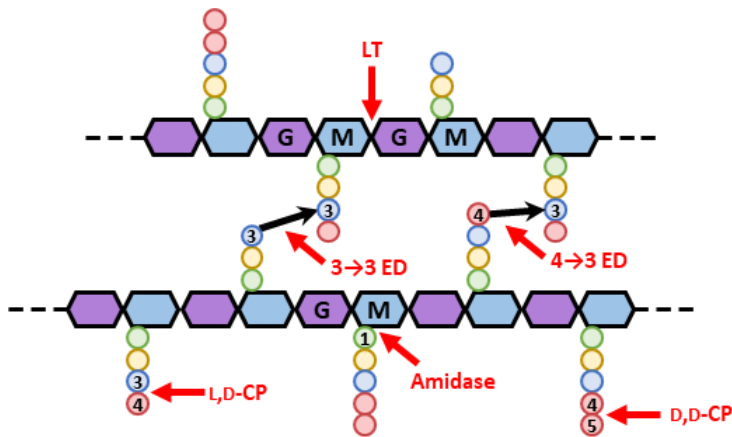


Figure 12. Réactions catalysées par les hydrolases du peptidoglycane chez *Escherichia coli*.

Les enzymes et les liaisons coupées sont indiquées en rouge. Abréviations : D,D-CP, D,D-carboxypeptidase ; ED, endopeptidase ; G, GlcNAc ; L,D-CP, L,D-carboxypeptidase ; LT, transglycosylase lytique ; M, MurNAc.

Transglycosylases lytiques. Les transglycosylases lytiques sont des *N*-acétyl-muramidases qui catalysent la coupure non hydrolytique de la liaison β -1,4 entre un MurNAc et un GlcNAc d'une chaîne glycanes (Höltje et al. 1975). La réaction catalysée par les transglycosylases lytiques induit la formation d'une liaison intramoléculaire entre le carbone C1 et le carbone C6 du MurNAc, formant une molécule de 1,6-anhydro-MurNAc (anhMurNAc) à l'extrémité réductrice d'une chaîne glycanes. Le rôle principal des transglycosylases lytiques est la création d'espace dans le périplasme (Höltje 1998). En coupant les chaînes glycanes, elles limitent l'encombrement périplasmique, permettent la séparation du septum, l'expansion et le recyclage du peptidoglycane, ainsi que l'incorporation de complexes multiprotéiques à travers la couche de peptidoglycane (Koraimann 2003; Weaver et al. 2022). Il existe neuf transglycosylases lytiques chez *E. coli*. Parmi ces neuf enzymes il y a sept lipoprotéines (MltABCDE et RlpA), une enzyme soluble (Slt) et une enzyme ancrée à la membrane interne (MltG).

Les activités *in vitro* de sept enzymes (MltABCDE et Slt) ont été testées dans une étude qui montre des préférences différentes de substrats (Lee et al. 2013). Sur des chaînes glycanes non pontées, toutes les transglycosylases lytiques testées présentaient une activité exolytique (qui coupe à l'extrémité des chaînes glycanes), et quatre d'entre elles (MltBDE et Slt) présentaient une activité endolytique (qui coupe dans les chaînes glycanes). Sur des chaînes glycanes pontées, seules quatre enzymes (MltABC et Slt) présentaient une activité exolytique. L'activité *in vitro* de MltA est plus importante à 30 °C qu'à 37 °C, et sa surexpression à 30 °C se traduit par la formation de sphéroblastes, suggérant un rôle de MltA pour la croissance à des

températures sous-optimales (Lommatzsch et al. 1997). Des analyses d'homologie de séquence suggèrent que la protéine RlpA est une transglycosylase lytique mais son activité n'a jamais été démontrée chez *E. coli*. L'activité de RlpA a seulement été démontrée pour la protéine homologue de *Pseudomonas aeruginosa* (Jorgenson et al. 2014). Chez *E. coli* l'activité *in vitro* de RlpA pourrait nécessiter un activateur, ou RlpA pourrait être uniquement impliquée dans la régulation d'autres enzymes (Pazos et al. 2020).

L'enzyme MltG est particulière car il s'agit de la seule transglycosylase lytique ancrée à la membrane interne par un segment transmembranaire (Yunck, Cho, and Bernhardt 2016). Les auteurs de l'étude identifiant MltG ont montré qu'elle s'associe à la PBP1b et qu'elle possède une activité endolytique. Les auteurs proposent que MltG coupe les chaînes glycanes en cours d'élongation pour permettre à PBP1b de commencer l'élongation d'une nouvelle chaîne glycane (fonction de « terminase »). D'autres travaux ont ensuite montré que MltG interagit également avec RodA et qu'elle produit *in vitro* des chaînes glycanes composées de 7 sous-unités (Bohrhunter et al. 2021; Sassine et al. 2021).

L'enzyme Slt (encodée par le gène *sltY*) est également particulière car il s'agit de la seule transglycosylase lytique soluble (Höltje et al. 1975). La fonction de Slt serait la prévention de l'incorporation aberrante de chaînes glycanes dans la couche de peptidoglycane par les L,D-transpeptidases lorsque le couplage entre glycosyltransférase et D,D-transpeptidase est inactivé, notamment par l'action des β -lactamines (Cho et al. 2014). La structure de Slt est en forme d'anneau dans lequel se loge les chaînes glycanes en cours de dégradation (Van Asselt, Thunnissen, and Dijkstra 1999; M. Lee et al. 2018). La bulgécine A est un inhibiteur spécifique de Slt (Templin, Edwards, and Höltje 1992).

Peu de phénotypes sont associés aux simples mutants des transglycosylases lytiques MltABCDEF. Une triple délétion de *mltC*, *mltD* et *mltE* induit un défaut de séparation des cellules filles et la formation de courtes chaînettes (de 3 à 6 cellules), et la délétion de *mltF* est impossible dans un mutant qui porte déjà les délétions de *mltABCDE* et *sltY*, démontrant ainsi le rôle essentiel des transglycosylases lytiques (Heidrich et al. 2002; Scheurwater and Clarke 2008).

Amidases. Le terme amidase désigne les enzymes avec une activité *N*-acétyl-muramyl-L-alanine amidase. Les amidases libèrent les tiges peptidiques des chaînes glycanes en catalysant l'hydrolyse de la liaison amide entre le résidu D-Lac d'une molécule de MurNAc et le L-Ala¹ de la tige peptidique. Les amidases sont principalement impliquées dans la séparation des cellules filles mais elles peuvent également avoir un rôle secondaire dans le recyclage du peptidoglycane (voir plus bas dans la section Recyclage du peptidoglycane). Il existe cinq amidases chez *E. coli*. Quatre d'entre elles sont périplasmiques (AmiABCD) et une d'entre elles est cytoplasmique (AmpD).

AmiA, AmiB et AmiC sont des amidases solubles. Elles sont spécifiquement actives sur des substrats contenant MurNAc et ne fonctionnent pas sur des substrats anhMurNAc. AmiB et AmiC sont recrutées au niveau du septum au moment de la division cellulaire grâce à la protéine FtsN tandis que AmiA n'y montre pas d'accumulation particulière (Peters, Dinh, and Bernhardt 2011). Leurs fonctions sont néanmoins redondantes car les simples délétions et les combinaisons de doubles délétions montrent toutes des phénotypes similaires : la présence de septa épais et la formation de courtes chaînettes allant de 3 à 4 cellules pour les simples mutants, et de 3 à 14 cellules pour les doubles mutants (Heidrich et al. 2001; Priyadarshini, De Pedro, and Young 2007). Le triple mutant est également viable et entraîne la formation de longues chaînettes allant de 20 à 60 cellules, démontrant ainsi le rôle des amidases dans la séparation des cellules filles. L'activité de de AmiA, AmiB et AmiC est régulée par d'autres protéines. La protéine de la membrane interne EnvC active AmiA et AmiB, et la lipoprotéine NlpD active AmiC (Uehara et al. 2010). Un modèle de régulation spatio-temporelle de AmiC a été proposé dans lequel l'invagination de la membrane externe pendant la constriction de l'anneau Z, grâce au système Tol-Pal, permet le rapprochement de la lipoprotéine NlpD et de AmiC au niveau du peptidoglycane (Tsang, Yakhnina, and Bernhardt 2017). La lipoprotéine ActS a récemment été identifiée comme étant également un activateur des trois amidases AmiA, AmiB et AmiC (Gurnani Serrano et al. 2021). Contrairement à *envC* et *nlpD*, le gène *actS* semble être exprimé en conditions de stress de l'enveloppe.

AmiD est une lipoprotéine capable de libérer les tiges peptidiques des chaînes glycanes, des disaccharides et des monosaccharides contenant MurNAc ou anhMurNAc (formés par les transglycosylases lytiques) (Uehara and Park 2007). Cette capacité à libérer la tige peptidique de substrats anhMurNAc fait de AmiD une enzyme spécialisée dans le recyclage des fragments de peptidoglycane qui se trouvent dans le périplasme. Contrairement aux trois autres amidases périplasmiques, son activité n'est pas requise pour la séparation des cellules filles.

AmpD est une amidase cytoplasmique capable de libérer la tige peptidique des disaccharides et monosaccharides contenant anhMurNAc (Hesek et al. 2009). AmpD est une amidase spécifiquement requise pour le recyclage du peptidoglycane. L'inactivation de AmpD entraîne l'accumulation cytoplasmique des fragments de peptidoglycane recyclés GlcNAc-anhMurNAc-tripeptide (Jacobs et al. 1994).

Endopeptidases. Le terme endopeptidase désigne les enzymes capables d'hydrolyser la liaison amide qui forme les ponts interpeptidiques du peptidoglycane de type 4→3 et/ou 3→3. A cause de la structure du peptidoglycane en « filet » formée par des liaisons covalentes, les endopeptidases étaient prédites depuis

plusieurs décennies comme ayant un rôle crucial dans l'expansion du peptidoglycane (Figure 13) (Höltje and Heidrich 2001; De Jonge et al. 1989). C'est en 2012 que l'équipe de Manjula Reddy a démontré l'essentialité des endopeptidases dans la croissance de *E. coli* (Singh et al. 2012). Il existe huit endopeptidases chez *E. coli*. Trois d'entre elles sont des endopeptidases à sérine-active appartenant à la famille des PBP (PBP4, PBP7 et AmpH), deux d'entre elles sont des endopeptidases à cystéine-active appartenant à la famille des NlpC/P60 peptidases (MepH et MepS), et les trois dernières endopeptidases sont des métalloenzymes qui appartiennent aux familles des LAS metallopeptidases, lysostaphin/M23 peptidases et M15 peptidases (MepA, MepM et MepK, respectivement). L'activité de ces huit endopeptidases a été démontrée *in vitro* sur des sacculi ou des mucopeptides purifiés (Chodiseti and Reddy 2019; Engel et al. 1992; Gonzalez-Leiza et al. 2011; Keck and Schwarz 1979; Korat et al. 1991; Romeis and Höltje 1994; Singh et al. 2012). Les huit endopeptidases sont capables d'hydrolyser les ponts 4→3. MepA a été la première endopeptidase identifiée comme étant capable d'hydrolyser les ponts 4→3 et 3→3 sans préférence de substrat notable. Par la suite, MepK a également été identifiée comme étant capable d'hydrolyser les deux types de ponts, mais avec une préférence très marquée pour les ponts 3→3. PBP4 et AmpH possèdent également une activité D,D-carboxypeptidase (voir plus bas). Ces endopeptidases sont principalement solubles, sauf AmpH qui est liée à la membrane interne, MepM qui est prédite comme étant liée à la membrane interne, et MepS qui est une lipoprotéine de la membrane externe. MepH, MepM et MepS sont les trois endopeptidases redondantes et essentielles pour l'expansion du peptidoglycane et la croissance de *E. coli*, et un mutant qui porte les délétions des trois gènes n'est pas viable (Singh et al. 2012). La triple délétion des gènes codant pour MepA, PBP4 et la PBP7 aggrave le phénotype de chaînette observé dans un triple mutant *amiA*, *amiB* et *amiC*, suggérant un rôle de ces trois endopeptidases dans la séparation des cellules filles (Heidrich et al. 2002). Un rôle de la PBP4 dans la division cellulaire a été davantage confirmé dans une étude récente, dans laquelle les auteurs proposent une coordination entre la PBP4 et les amidases pour le recrutement de FtsN au divisome (Verheul et al. 2022).

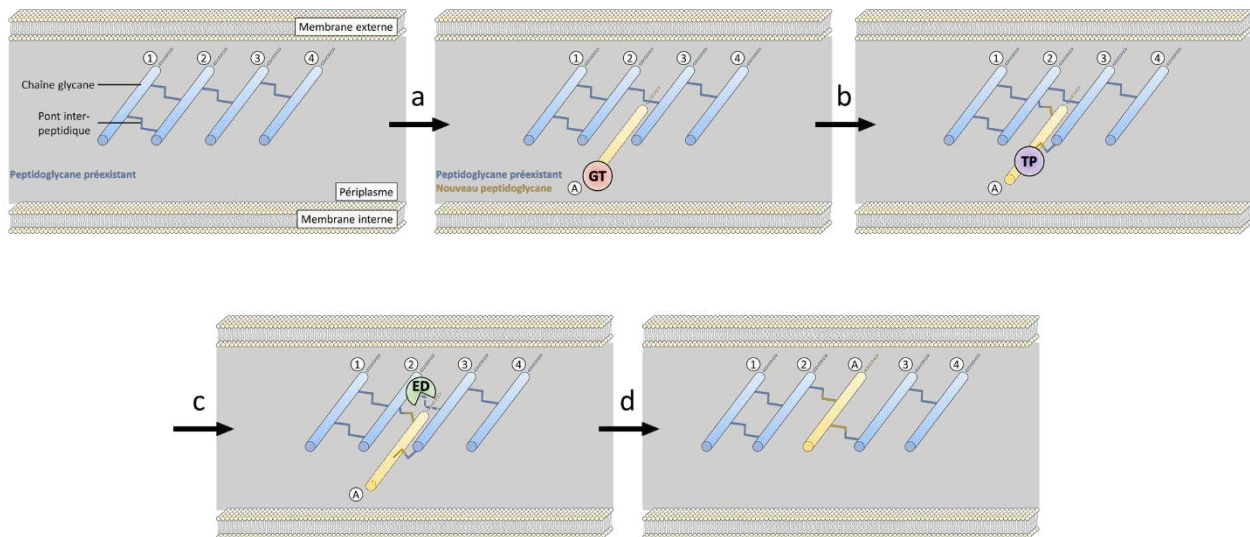


Figure 13. Modèle d'insertion des chaînes glycanes par les endopeptidases.

D'après ce modèle, une nouvelle chaîne glycane est polymérisée (chaîne A) par les glycosyltransférases (GT, étape a) puis attachée au peptidoglycane préexistant (chaînes 2 et 3) par les transpeptidases (TP, étape b). L'hydrolyse des ponts interpeptidiques reliant les chaînes 2 et 3 par les endopeptidases (ED, étape c) permet l'ouverture de la couche de peptidoglycane et l'insertion de la chaîne A (étape d). Ce modèle s'applique à l'élongasome dans lequel une chaîne glycane s'insère à la fois (Atze et al. 2022). D'autres modèles existent où plusieurs chaînes glycanes s'insèrent en même temps et où les anciennes chaînes sont dégradées par l'action des transglycosylases lytiques.

L'équipe de Thomas G. Bernhardt a montré que la surproduction des endopeptidases MepA, MepM, MepS et PBP7 stimule la synthèse du peptidoglycane par les aPBP, ce qui confère une résistance partielle au mecillinam en redirigeant le flux des précurseurs du peptidoglycane de l'élongasome vers les aPBP (Lai et al. 2017). Les auteurs suggèrent que les ouvertures dans la couche du peptidoglycane induites par les endopeptidases permettent à PBP1a et PBP1b d'interagir avec leur lipoprotéines respectives LpoA et LpoB. Dans une autre étude, la même équipe a ensuite montré que la surproduction des endopeptidases MepS ou MepM, et donc la redirection de la synthèse du peptidoglycane vers les aPBP, était létale dans un mutant déficient du gène *ftsP* codant pour une protéine accessoire du divisome (Truong, Vettiger, and Bernhardt 2020). Ces deux études suggèrent que les endopeptidases MepA, MepM, MepS et PBP7 sont impliquées dans la synthèse du peptidoglycane médiée par les aPBP, et que la régulation de l'activité des endopeptidases est cruciale pour permettre une bonne coordination spatio-temporelle entre synthèse et dégradation du peptidoglycane. La lipoprotéine Nlpl permet cette coordination en formant des complexes multiprotéiques reliant PBP1a et LpoA aux endopeptidases MepS, MepM, PBP4 et PBP7 (Banzhaf et al. 2020). Nlpl sert également d'adaptateur qui guide MepS jusqu'à la protéase périplasmique Prc, permettant de contrôler la quantité de MepS (Singh et al. 2015; Su et al. 2017). En adéquation avec ce rôle régulateur, l'absence de Nlpl entraîne une augmentation de la quantité de MepS dans le périplasme et la

surexpression de Nlpl entraîne une diminution de la quantité de MepS. Chez *Vibrio cholerae*, l'homologue de MepM, ShyA, présente une conformation active (ouverte) et une conformation inactive (fermée) (Shin et al. 2020). Les auteurs de cette étude ont montré que ce changement de conformation est conservé entre les endopeptidases de cette famille d'enzyme, et donc qu'il s'applique également à MepM de *E. coli*. Le mécanisme qui déclenche le changement de conformation est inconnu. Les auteurs proposent qu'il existe un réservoir d'endopeptidases inactives qui pourraient s'activer en fonction des conditions de croissance. Une telle adaptation permettrait de réagir plus rapidement que par une régulation transcriptionnelle à des changements dans les conditions du milieu extérieur. Une autre hypothèse présentée par les auteurs est qu'un changement de conformation pourrait s'opérer lorsque l'endopeptidase détecte des différences de tension dans la couche de peptidoglycane.

D'autres rôles ont également été attribués aux endopeptidases chez d'autres espèces de bactéries. Chez *Helicobacter pylori* par exemple, l'endopeptidase HdpA est impliquée dans la régulation de la morphologie (Bonis et al. 2010). L'absence de cette endopeptidase modifie la forme des cellules et diminue la colonisation de l'estomac des souris, alors que sa surexpression entraîne la formation de cellules sphériques. Chez *Mycobacterium smegmatis*, l'endopeptidase DacB2 est impliquée dans la maturation du peptidoglycane et permet la transition entre un peptidoglycane néosynthétisé relié par des ponts 4→3 au niveau des pôles vers un peptidoglycane mûré relié par des ponts 3→3 le long de la paroi latérale de la bactérie (Baranowski et al. 2018). Chez *Mycobacterium tuberculosis*, l'endopeptidase RipA est essentielle pour la croissance des bactéries dans les macrophages et pour la persistance dans un modèle murin (Healy, Gouzy, and Ehrt 2020). Lors des infections par *Neisseria gonorrhoeae*, l'enzyme bifonctionnelle LdcA, une endopeptidase et L,D-carboxypeptidase, contribue à la pathogénicité en permettant le relargage dans le milieu extérieur de fragments de peptidoglycane portant des tiges tripeptides. Ces muuropeptides sont détectés par les récepteurs NOD1 du système immunitaire inné (Lenz, Hackett, and Dillard 2017).

Carboxypeptidases. Le terme carboxypeptidases désigne les enzymes qui hydrolysent la liaison amide entre les acides aminés à l'extrémité d'une tige peptidique. Les D,D-carboxypeptidases hydrolysent la liaison entre le D-Ala⁴ et le D-Ala⁵ d'une tige pentapeptide et les L,D-carboxypeptidases hydrolysent la liaison entre le DAP³ et le D-Ala⁴ d'une tige tetrapeptide, relarguant dans les deux cas une molécule de D-Ala.

Il existe six D,D-carboxypeptidases chez *E. coli*, et elles appartiennent toutes à la famille des PBP. Il s'agit des PBP4, PBP4b, PBP5, PBP6a, PBP6b et de AmpH (voir chapitre 2.2 sur les PBP pour plus de détails). PBP4 et AmpH possèdent également une activité endopeptidase 4→3 (voir plus haut). La PBP5, encodée par le

gène *dacA*, est la D,D-carboxypeptidase majoritaire de *E. coli*. La PBP5 est insensible à la majorité des β -lactamines, elle contribue à la morphologie et participe à la maturation du peptidoglycane dans l'élongasome et le divisome (Kocaoglu and Carlson 2015; Nelson and Young 2000, 2001; Potluri et al. 2010; Potluri, de Pedro, and Young 2012). La PBP6b a été identifiée comme importante pour conserver la morphologie des cellules à pH acide (Peters et al. 2016). L'expression, la stabilité et l'activité de la PBP6b augmente à pH 5, suggérant une spécialisation de cette D,D-carboxypeptidase pour la croissance en pH acide. L'analyse du peptidoglycane de *E. coli* montre une quantité négligeable de tiges pentapeptides (Glauner 1988; De Jonge et al. 1989). Cette observation démontre qu'au cours de la synthèse des nouvelles chaînes glycanes, si une tige pentapeptide n'est pas utilisée par une D,D-transpeptidase pour faire un pont 4 \rightarrow 3 elle sera immédiatement prise en charge et maturée en tige tetrapeptide par les D,D-carboxypeptidases. Cette maturation immédiate des tiges pentapeptides pourrait avoir un rôle dans la coordination entre transglycosylation et D,D-transpeptidation, empêchant à la dernière réaction de se produire en dehors des sites de synthèse des nouvelles chaînes glycanes. Cette D,D-carboxypeptidation quasi-immédiate des tiges pentapeptides permet également de disposer sur la totalité de la surface du peptidoglycane des tiges tetrapeptides qui pourront servir de substrats aux L,D-transpeptidases (voir chapitre 2.5). Une étude récente a démontré que l'assemblage des OMP par le système BAM dans la membrane externe était couplé à la synthèse du peptidoglycane (Mamou et al. 2022). Les auteurs de cette étude ont montré que les tiges tetrapeptides, mais pas pentapeptides, inhibent le complexe BAM et donc la synthèse des OMP. Les auteurs proposent donc que les OMP sont assemblées par le complexe BAM dans les zones de synthèse du peptidoglycane, où il y a des tiges pentapeptides. Par conséquent, les D,D-carboxypeptidases régulent également la synthèse spatio-temporelle des OMP et contribuent ainsi à la stabilité de la membrane externe. En plus des six D,D-carboxypeptidases présentées, les aPBP possèdent une faible activité D,D-carboxypeptidase *in vitro* (Egan et al. 2015; Typas et al. 2010). Cette légère activité D,D-carboxypeptidase permettrait d'hydrolyser l'acyl-enzyme lorsque les D,D-transpeptidases ne trouvent pas de tige peptidique accepteuse à proximité pour former un pont 4 \rightarrow 3. Cette faible activité D,D-carboxypeptidase n'a pas été démontrée pour les bPBP de *E. coli* mais il est probable qu'elles puissent également réagir avec une molécule d'eau pour ne pas rester bloquées sous la forme d'acyl-enzyme.

LdcA est la seule L,D-carboxypeptidase monofonctionnelle de *E. coli*. LdcA est cytoplasmique et permet le recyclage des tiges tetrapeptides en provenance du périplasme (voir plus bas dans la section Recyclage du peptidoglycane) (Templin, Ursinus, and Höltje 1999). Tout comme les D,D-transpeptidases qui possèdent une activité D,D-carboxypeptidase, les L,D-transpeptidases possèdent une activité L,D-carboxypeptidase *in vitro* (Hugonnet et al. 2016; Triboulet et al. 2015). L'activité L,D-carboxypeptidase des LDT leur permettrait,

comme pour les D,D-transpeptidases, de se libérer de la tige donneuse lorsqu'il n'y a pas de tige accepteuse pour attaquer l'acyl-enzyme.

Recyclage du peptidoglycane. Les fragments de peptidoglycane générés par les hydrolases peuvent être recyclés dans le cytoplasme. Le recyclage du peptidoglycane n'est pas essentiel dans les conditions de croissance en laboratoire, mais ce processus complexe est important pour (i) limiter les dépenses énergétiques, (ii) détecter et réguler l'équilibre entre synthèse et dégradation du peptidoglycane, et (iii) éviter le relargage de molécules pro-inflammatoires reconnues par le système immunitaire inné (Bastos, Wheeler, and Boneca 2020; Johnson, Fisher, and Mobashery 2013). Chez *E. coli*, 40 à 50% du peptidoglycane est dégradé à chaque génération et plus de 90% des fragments sont recyclés (Figure 14). Les tiges tetra ou tripeptides libres, générées par les amidases, s'associent aux protéines périplasmiques MppA ou OppA qui amènent les tiges peptidiques vers la perméase Opp (composée des protéines OppBCDF), qui assure leur transport jusqu'au cytoplasme (Park et al. 1998). Cette voie de recyclage des tiges peptidiques libres générées par les amidases semble assez mineure car l'absence de Opp n'affecte pas le renouvellement du peptidoglycane (Park 1993). La majorité du recyclage passe par les fragments de GlcNAc-anhMurNAc additionnés ou non d'une tige peptidique, générés par les transglycosylases lytiques, qui sont directement transportés dans le cytoplasme par la perméase AmpG (Jacobs et al. 1994). Une fois dans le cytoplasme, les fragments GlcNAc-anhMurNAc sont pris en charge par l'amidase AmiD qui coupe éventuellement la tige peptidique et par la glucosaminidase NagZ qui coupe la liaison entre le GlcNAc et l'anhydromuramine. Le GlcNAc et l'anhydromuramine vont subir une série de réactions pour les convertir *in fine* en glucosamine-6-phosphate qui pourra être converti en fructose-6-phosphate pour entrer dans la glycolyse ou en UDP-GlcNAc pour alimenter la synthèse du peptidoglycane, des LPS ou des ECA (Johnson et al. 2013). Les tetrapeptides importés du périplasma ou générés par AmiD sont convertis en tripeptides par l'activité L,D-carboxypeptidase de LdcA. Les tripeptides sont ensuite liés à une molécule d'UDP-MurNAc par la ligase Mpl pour retourner dans la synthèse du peptidoglycane, ou sont convertis en acides aminés par les enzymes MpaA, YcjG et PepD. L'absence de LdcA entraîne une accumulation létale en phase stationnaire d'UDP-MurNAc-tetrapeptides générés par Mpl (Templin et al. 1999). En absence de LdcA, l'UDP-MurNAc-tetrapeptide généré par Mpl ne pourra pas être converti en UDP-MurNAc-pentapeptide car la formation de ce dernier nécessite l'ajout du dipeptide D-Ala⁴-D-Ala⁵ par MurF sur une molécule d'UDP-MurNAc-tripeptide (voir chapitre 2.1.1). La toxicité des UDP-MurNAc-tetrapeptides générés par Mpl en absence de LdcA a été attribuée au fait que les D,D-transpeptidases ne peuvent pas utiliser les tiges tetrapeptides comme substrats.

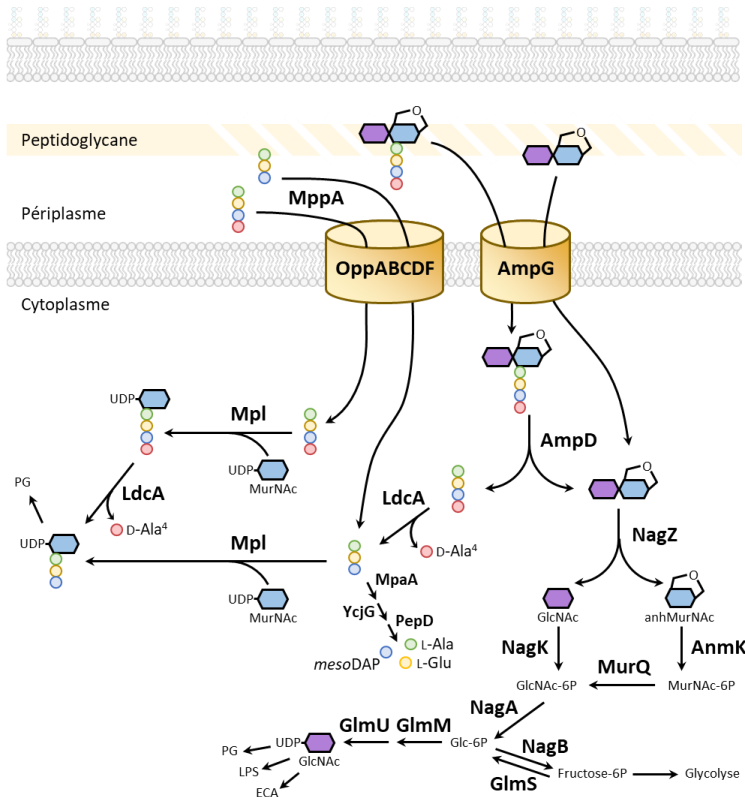


Figure 14. Recyclage du peptidoglycane chez *Escherichia coli*.

Les fragments de peptidoglycane générés par les hydrolases sont transportés jusqu'au cytoplasme. Dans le cytoplasme, les sucres sont transformés en Glc-6P qui alimente la glycolyse ou la synthèse des composants de l'enveloppe. Les tiges peptidiques peuvent être dégradées en acide aminés ou recyclées sur l'UDP-MurNAc pour directement alimenter la synthèse du peptidoglycane.

2.5 Les L,D-transpeptidases

Dès la fin des années 1960, la communauté scientifique savait que les ponts de type 4→3 n'étaient pas les seuls ponts du peptidoglycane de *E. coli* (Schwarz, Asmus, and Frank 1969). Dans le peptidoglycane de *E. coli*, les ponts de type 3→3 représentent respectivement environ 5% et 13% de la totalité des mucopeptides en phase exponentielle de croissance et en phase stationnaire (Blasco, Pisabarro, and de Pedro 1988; Glauner 1988; Pisabarro et al. 1985). Les enzymes responsables de la formation des ponts 3→3, les L,D-transpeptidases (LDT), ont été découvertes 36 ans après l'identification de ce type de pont (Mainardi et al. 2005). La première LDT identifiée provient d'un mutant de *Enterococcus faecium* résistant à l'ampicilline et sélectionné en laboratoire. Dans ce mutant, la L,D-transpeptidase Ldt_{fm} assure la transpeptidation du peptidoglycane à la place des D,D-transpeptidases, conférant ainsi une résistance aux β-lactamines. Après la découverte de Ldt_{fm}, d'autres LDT ont été identifiées et les analyses du peptidoglycane d'autres bactéries ont révélé la présence d'une grande proportion de ponts 3→3 chez

certaines d'entre elles. Les ponts de type 3→3 représentent entre 60 et 80% de la totalité des ponts chez des bactéries pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium abscessus* et *Clostridium difficile* (Figure 15) (Lavollay et al. 2008, 2011; Peltier et al. 2011). L'étude du rôle physiologique des LDT est aujourd'hui un sujet de recherche important qui occupe de nombreuses équipes à travers le monde.

Phylum/Espèce	Proportion de ponts 3→3 (%)
<i>Firmicutes</i>	
<i>Enterococcus faecium</i>	3
<i>Clostridium difficile</i>	70
<i>Gammaproteobacteria</i>	
<i>Escherichia coli</i>	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
<i>Enterobacter cloacae</i>	20
<i>Vibrio cholerae</i>	2
<i>Actinomycetales</i>	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	60 - 80
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	60
<i>Mycobacterium abscessus</i>	70
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	40
<i>Streptomyces coelicolor</i>	60
<i>Alphaproteobacteria</i>	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40 - 60

Figure 15. Proportions de ponts de type 3→3 dans diverses espèces bactériennes provenant de quatre phyla différents.

Les différentes valeurs proviennent des références (Brown et al. 2012; Cava, De Pedro, et al. 2011; Hugonnet et al. 2014; Kumar et al. 2012; Lavollay et al. 2008, 2009, 2011; Mainardi et al. 2002; Peltier et al. 2011; Pisabarro et al. 1985; Quintela, Caparrós, and de Pedro 1995; Rimal et al. 2022).

Structure des L,D-transpeptidases. Les LDT ne sont pas apparentées aux D,D-transpeptidases de la famille des PBP. Différentes études structurales montrent que la structure des LDT est conservée (Figure 16) (Biarrotte-Sorin et al. 2006; Böth et al. 2013; Correale et al. 2013). Les LDT fonctionnent en monomère et sont composées d'un domaine C-ter catalytique et d'un domaine N-ter non catalytique, probablement impliqué dans des interactions protéines-protéines et souvent ancré à la membrane interne. Le domaine catalytique C-ter est un domaine YkuD (nommé par la ressemblance avec la L,D-transpeptidase putative YkuD de *Bacillus subtilis*, qui est le premier représentant de la famille des L,D-transpeptidases dont la structure a été résolue) (Bielnicki et al. 2006). Ce domaine contient la cystéine catalytique responsable de la formation de l'acyl-enzyme avec les tiges tetrapeptides du peptidoglycane. Les LDT peuvent varier en taille et en domaine. Chez *Mycobacterium tuberculosis* par exemple, Ldt_{M12} et Ldt_{M15} sont plus grandes que Ldt_{M11} et Ldt_{M13} car les deux premières LDT possèdent un domaine supplémentaire qui pourrait leur servir de piédestal, comme pour le domaine N-ter des bPBP. Chez *E. coli*, la LDT YcbB possède un domaine d'interaction avec le peptidoglycane situé entre les domaines N-ter et C-ter. Les différences structurales

entre les LDT et les PBP font que les LDT sont uniquement inhibées par les β -lactamines de la famille des carbapénèmes, et parfois dans une moindre mesure par les céphalosporines. Les structures de plusieurs LDT en complexe avec des carbapénèmes ont été obtenues (Bianchet et al. 2017; Correale et al. 2013; Kumar et al. 2017).

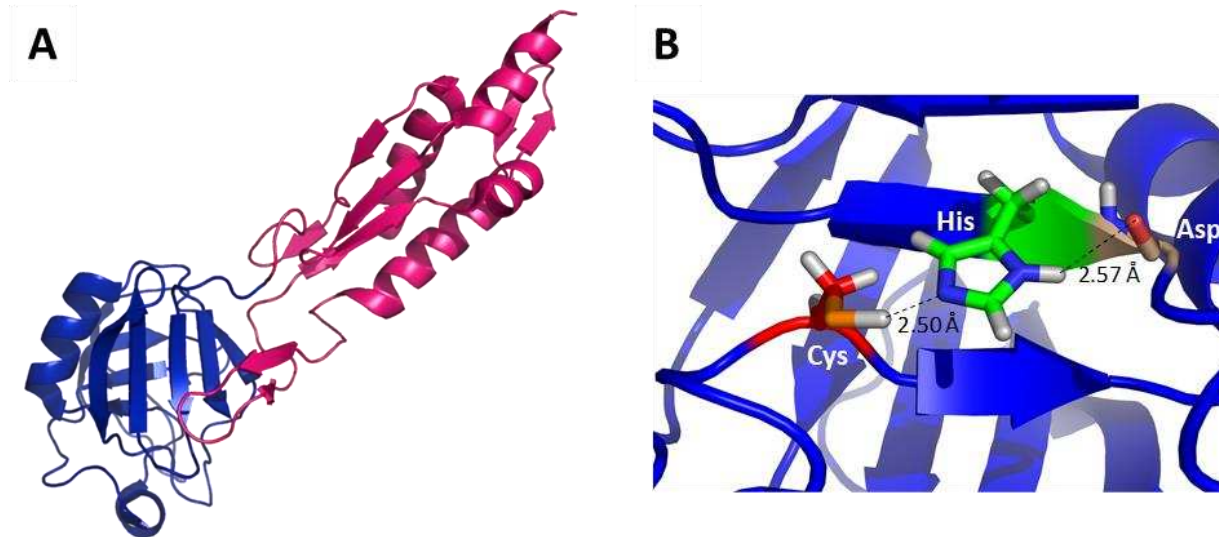


Figure 16. Structure de la L,D-transpeptidase modèle Ldt_{fm} de *Enterococcus faecium*.

(A) Représentation des domaines N-ter de fixation au peptidoglycane (rose) et C-ter de L,D-transpeptidation (bleu) de Ldt_{fm} (PDB 1ZAT). (B) La triade catalytique de Ldt_{fm} est composée d'une cystéine, une histidine et une asparagine connectées par des liaisons hydrogènes.

2.5.1 Fonctions des L,D-transpeptidases

Les D,D-transpeptidases sont étudiées en détail depuis plus de 50 ans. Ce n'est que récemment que les LDT ont commencé à être étudiées étant donné leur découverte relativement récente. Contrairement aux D,D-transpeptidases, il ne semble pas y avoir de fonction évidente que nous pouvons attribuer aux LDT. Les LDT remplissent des fonctions assez variées qui diffèrent selon les espèces.

Escherichia coli. Il y a six enzymes avec un domaine YkuD dont cinq LDT chez *E. coli*. Les trois premières LDT de *E. coli* à avoir été identifiées sont ErfK, Ybis et YcfS (renommées ensuite en LdtA, LdtB et LdtC, respectivement). Ces trois LDT sont particulières car elles ne forment pas de ponts de type 3→3, mais elles ancrent la lipoprotéine de Braun (Lpp) au peptidoglycane (Braun and Wolff 1970; Magnet et al. 2007). La réaction catalysée par ces trois LDT est la même pour que pour la formation d'un pont 3→3, à l'exception que ce n'est pas un résidu DAP³ d'une tige accepteuse qui attaque l'acyl-enzyme mais le groupement amine de la lysine en C-ter de la Lpp (Figure 17). Ces trois LDT sont par conséquent importantes dans la stabilité de l'enveloppe car elles assurent le seul lien covalent entre le peptidoglycane et la membrane

externe. L'absence de ces trois LDT augmente la perméabilité de la membrane externe (Sanders and Pavelka 2013). Les deux autres LDT à avoir été identifiées sont YcbB et YnhG (renommées ensuite en LdtD et LdtE, respectivement). Ces deux LDT sont responsables de la formation des ponts de type 3→3 dans le peptidoglycane de *E. coli* (Magnet et al. 2008).

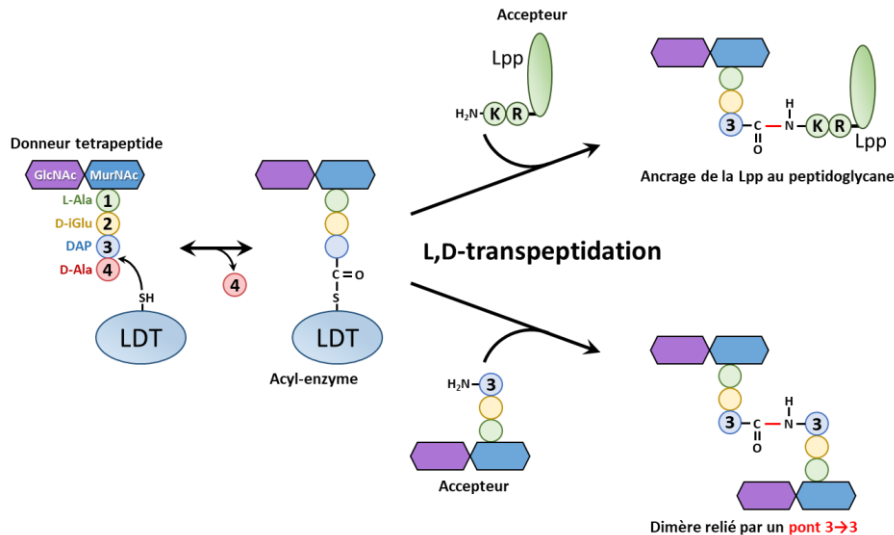


Figure 17. Réaction de L,D-transpeptidation catalysée par les L,D-transpeptidases.

L'attaque nucléophile de la cystéine catalytique de la LDT sur la liaison amide reliant le DAP³ au D-Ala⁴ d'une tige donneuse tetrapeptide entraîne la formation d'un acyl-enzyme reliant la cystéine catalytique de la LDT au DAP³ de la tige donneuse par une liaison thioester, libérant le D-Ala⁴. Le groupement amine de la lysine N-terminale de la Lpp peut attaquer la liaison thioester et ancrer la Lpp au peptidoglycane (réaction catalysée par ErfK, YbiS et YcfS). Le groupement amine du résidu en position 3 d'une tige accepteuse peut attaquer la liaison thioester et former un dimère relié par un pont de type 3→3 (réaction catalysée par YcbB et YnhG).

YcbB est sous le contrôle du régulateur transcriptionnel CpxR du système à deux composants de réponse au stress de l'enveloppe Cpx (Bernal-Cabas, Ayala, and Raivio 2015; Delhaye, Collet, and Laloux 2016). Les stress de l'enveloppe, comme des protéines mal repliées dans le périplasma ou les membranes, sont détectés par la lipoprotéine NlpE et la protéine de la membrane interne CpxA, qui s'autophosphoryle et active le régulateur transcriptionnel CpxR (Delhaye, Laloux, and Collet 2019). L'activation de CpxR augmente le niveau d'expression de *ycbB* et augmente la quantité de ponts 3→3 dans le peptidoglycane. YnhG est sous le contrôle d'un promoteur reconnu par le facteur σ^5 (σ^{38} , encodé par le gène *rpoS*) (Weber et al. 2005). σ^5 est un facteur sigma alternatif de réponse à différents stress qui contrôle en particulier l'expression d'un grand nombre de gènes induits en phase stationnaire [voir (Ishihama 2018) pour une revue sur σ^5]. Des résultats non publiés obtenus au laboratoire ont montré que l'augmentation de la quantité de ponts 3→3 observée en phase stationnaire est dû à l'augmentation de l'expression de *ynhG* (Blasco et al. 1988; Glauner 1988; Pisabarro et al. 1985).

Bien que YcbB et YnhG soient finement régulées, ces deux LDT ne sont pas essentielles et leur absence n'impacte pas la survie en phase stationnaire, en faible osmolarité ou en présence de β -lactamines (Sanders and Pavelka 2013). Le rôle de YcbB et de YnhG dans l'homéostasie de l'enveloppe est par conséquent le sujet de nombreuses études.

Le maillage du peptidoglycane forme des pores qui permettent la diffusion passive de nutriments et de protéines (Meroueh et al. 2006). Des expériences sur des sacculi purifiés ont montré la diffusion à travers le peptidoglycane de molécules d'environ 2 nm de rayon, ce qui correspond à des protéines globulaires de 22 à 24 kDa (Demchick and Koch 1996). Néanmoins, les auteurs précisent qu'un peptidoglycane étiré par la pression osmotique du cytoplasme pourrait permettre la diffusion de protéines allant jusqu'à 50 kDa. L'augmentation de la quantité totale de ponts dans le peptidoglycane grâce à une augmentation de la synthèse des ponts 3 \rightarrow 3 permettrait de diminuer cette diffusion en diminuant la taille des pores. Cela pourrait permettre de diminuer le relargage de molécules dans le milieu extérieur et contribuer à limiter les dépenses énergétiques. Une diminution de la taille des pores permettrait également d'augmenter la rigidité du peptidoglycane et de potentiellement contrebalancer des défauts de l'enveloppe. En adéquation avec sa régulation dépendante de σ^S , YnhG pourrait avoir un rôle dans le contrôle de la taille des pores en phase stationnaire.

Une autre étude a également démontré l'existence de larges pores allant jusqu'à 66 nm² de surface sur des sacculi purifiés (alors que la surface moyenne des pores est d'environ 5 nm²) (Turner et al. 2018). Des protéases sont couramment utilisées pour la purification des sacculi, et ces larges pores pourraient vraisemblablement venir de la protéolyse de complexes multiprotéiques traversant le périplasme et reliant les membranes internes et externes (élongasome, divisome, pompe à efflux, flagelles, etc.). Les auteurs suggèrent assez naturellement que la présence de ces larges pores pourrait poser des problèmes majeurs à l'intégrité de l'enveloppe. En adéquation avec sa régulation dépendante de CpxR, YcbB pourrait permettre de combler ces pores lorsque les machineries multiprotéiques se désassemblent. Dans le sens de cette hypothèse, une étude a montré un rôle de YcbB lorsque le système d'export des LPS se désassemble (Morè et al. 2019). Les auteurs ont montré qu'une diminution de la quantité de la protéine LptC, impliquée dans le système d'export du LPS, induit une augmentation de la quantité de ponts 3 \rightarrow 3 dans le peptidoglycane. La déplétion en LptC induit l'arrêt de la croissance bactérienne, et la présence de YcbB est nécessaire pour empêcher la lyse des cellules. Ce sauvetage de la lyse bactérienne par YcbB, induite par un défaut de synthèse des LPS, nécessite l'activité D,D-carboxypeptidase de la PBP6a, l'activité glycosyltransférase de la PBP1b ainsi que sa lipoprotéine associée LpoB. Les auteurs de cette étude

proposent que YcbB est un composant essentiel d'un système de réparation du peptidoglycane, un « repairosome » (par analogie anglicisée avec l'élongasome et le divisome).

La sixième enzyme, YafK (renommée ensuite en LdtF, puis en DpaA), était considérée pendant longtemps comme une LDT car elle possède un domaine YkuD, mais son activité L,D-transpeptidase n'avait jamais été démontrée *in vivo* ou *in vitro*. Deux études récentes ont définitivement montré que YafK n'est pas une LDT mais une endopeptidase particulière qui coupe la liaison formée par ErfK, YbiS ou YcfS reliant une tige tripeptide à la Lpp (Bahadur, Chodisetti, and Reddy 2021; Winkle et al. 2021). En hydrolysant la liaison entre le peptidoglycane et la Lpp, YafK contribue notamment à la survie de *E. coli* lorsque les cellules deviennent sphériques en présence de mecillinam.

***Salmonella enterica*.** Comme chez *E. coli*, il existe cinq LDT chez *Salmonella enterica*. La toxine typhoïde sécrétée par le pathogène *S. enterica* sérovar *Typhi* est un facteur de virulence essentiel. La toxine est produite dans le cytoplasme, exportée vers le périplasme et sécrétée dans le milieu extérieur. La sécrétion se fait au niveau des pôles de la bactérie dans les vacuoles intracellulaires où se trouve la bactérie (Chang, Song, and Galán 2016). Une étude a montré que la toxine devait passer à travers le peptidoglycane pour atteindre la membrane externe, où elle pourra alors être sécrétée (Figure 18) (Geiger et al. 2018). Le passage de la toxine à travers le peptidoglycane fait intervenir la LDT YcbB (l'homologue de *E. coli*) ainsi que la muramidase TtsA. Au niveau des pôles de *S. Typhi*, le peptidoglycane est modifié par YcbB qui catalyse la formation de ponts 3→3. La muramidase TtsA reconnaît spécifiquement les ponts de type 3→3 et coupe les chaînes glycanes modifiées par YcbB. L'action de YcbB et de TtsA permet ainsi de créer une ouverture localisée dans la couche de peptidoglycane, ce qui permet le passage de la toxine. Cette étude a révélé un nouveau rôle des LDT dans le transport et la sécrétion de toxine. Ce rôle pourrait être conservé dans d'autres espèces et étendu à d'autres protéines.

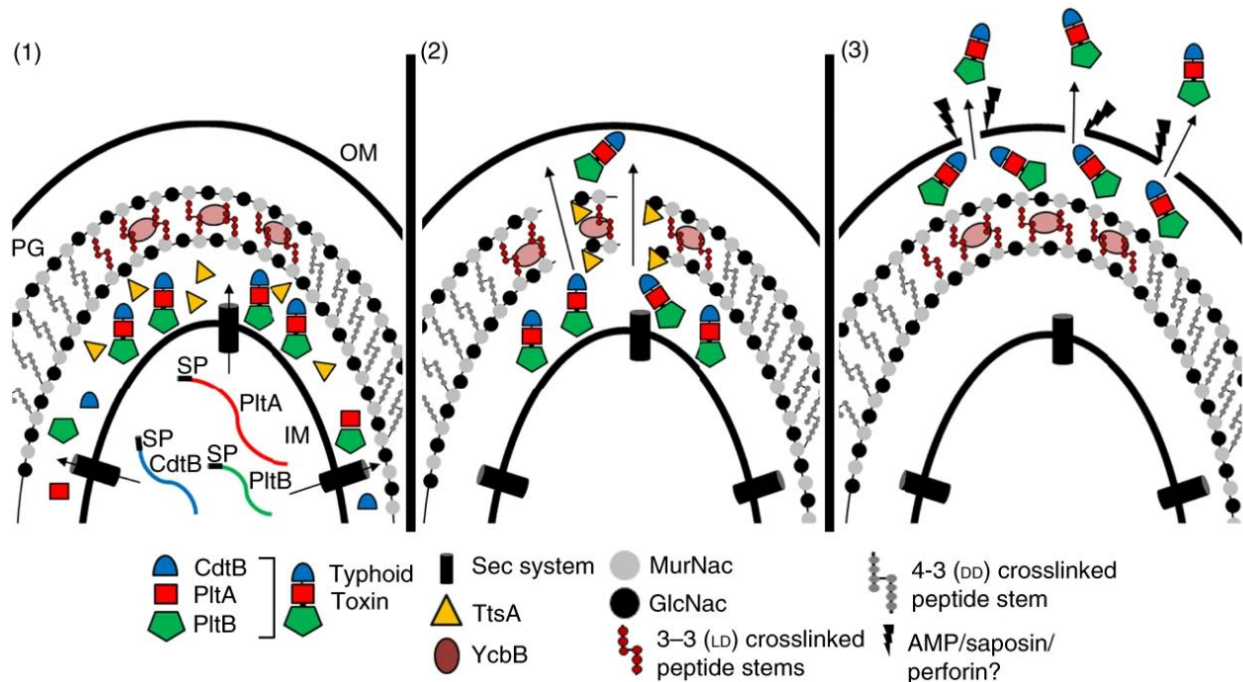


Figure 18. Mécanisme d'export de la toxine typhoïde médié par YcbB chez *Salmonella*.

(1) Le modèle propose que les trois sous-unités de la toxine typhoïde passent à travers la membrane interne (IM) par le système Sec pour rejoindre le périplasme où la toxine est assemblée. (2) YcbB modifie la couche de peptidoglycane au niveau des pôles en ajoutant des ponts de type 3→3. La muramidase TtsA reconnaît spécifiquement ces ponts de type 3→3 et dégrade le peptidoglycane pour laisser passer la toxine. (3) Une fois positionnée au niveau de la membrane externe (OM) la toxine est prête pour être excrétée dans le milieu extérieur si la membrane externe rencontre des perturbations. Figure provenant de la référence (Geiger et al. 2018).

***Vibrio cholerae*.** Il existe deux LDT chez *Vibrio cholerae*, LdtA et LdtB, qui ont respectivement une forte identité de séquence avec YcbB et YnhG et avec ErfK, YbiS et YcfS de *E. coli*. En adéquation, LdtA catalyse la formation de ponts 3→3 et LdtB catalyse l'ancrage de la Lpp au peptidoglycane (Cava, De Pedro, et al. 2011). LdtA et LdtB sont également capables de réaliser une réaction d'échange du résidu en quatrième position d'une tige tetrapeptide. LdtA et LdtB sont capables de remplacer la D-Ala⁴ par un acide aminé de conformation D dit « non-classique » car peu fréquent dans le peptidoglycane des bactéries. Les auteurs de l'étude ayant identifié LdtA et LdtB ont spécifiquement montré que ces LDT pouvaient remplacer le D-Ala⁴ par un résidu D-Met⁴. Le D-Met est synthétisé dans le périplasme à partir de L-Met grâce à la racémase périplasmique BsrV. L'absence de D-Met⁴ dans le peptidoglycane, obtenu par la double délétion de *ldtA* et *ldtB* ou par la simple délétion de *bsrV*, entraîne une accumulation anormale de peptidoglycane dans le périplasme. Cette accumulation de peptidoglycane augmente la sensibilité des cellules aux stress osmotiques. Ces acides aminés non-classiques de conformation D incorporés par les LDT sont donc

importants pour la stabilité de l'enveloppe de *V. cholerae* et pourrait modifier les propriétés du peptidoglycane ou réguler l'activité des PBP (Lam et al. 2009).

Mycobacterium. Les LDT sont particulièrement importantes chez les bactéries du genre *Mycobacterium*. Les chaînes glycanes des mycobactéries pathogènes *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium abscessus* et de la mycobactérie modèle non pathogène *Mycobacterium smegmatis* sont reliées par une majorité de ponts de type 3→3 (60 à 80% de la totalité des ponts) (Lavollay et al. 2008, 2011; Rimal et al. 2022). Il existe cinq LDT chez *M. tuberculosis* et chez *M. abscessus* (Ldt_{Mt1} à Ldt_{Mt5} et Ldt_{Mab1} à Ldt_{Mab5}, respectivement), et six LDT chez *M. smegmatis* (LdtABCEFG). Un modèle de synthèse et de maturation du peptidoglycane chez les mycobactéries a récemment été proposé (Figure 19) (Baranowski et al. 2018; García-Heredia et al. 2018; Shaku and Kana 2018). Les auteurs de ces études ont montré que l'activité des LDT de *M. smegmatis* est localisée le long de la paroi latérale de la bactérie et pas au niveau des pôles (où se situe la synthèse du peptidoglycane chez les mycobactéries). En condition de faible osmolarité, l'absence des LDT de *M. smegmatis* entraîne la formation de bourgeonnement sur la paroi latérale, suivi de la lyse d'une partie de la population. L'endopeptidase 4→3 DacB2 coupe les ponts 4→3 du peptidoglycane néosynthétisé le long de la paroi latérale, puis les LDT restaurent la réticulation en formant des ponts 3→3 à partir des produits de DacB2. Les LDT sont donc impliquées dans la maturation du peptidoglycane de *M. smegmatis* mais le rôle physiologique de cette maturation n'est toujours pas compris. En adéquation avec ce modèle, l'absence de Ldt_{Mt1} et Ldt_{Mt2} chez *M. tuberculosis* induit également la formation de bourgeonnements le long de la paroi latérale (Schoonmaker, Bishai, and Lamichhanea 2014). Ces deux LDT sont également nécessaires à la pathogénicité de *M. tuberculosis*. L'infection de souris avec un mutant de *M. tuberculosis* Δ ltd_{Mt1} Δ ltd_{Mt2} n'entraîne aucune mortalité jusqu'à 300 jours post-infections, contre 100% de mortalité à 150 jours avec la souche sauvage. Enfin, l'absence des LDT de *M. smegmatis* et l'absence de Ldt_{Mt1} et Ldt_{Mt2} de *M. tuberculosis* entraînent une augmentation de la sensibilité aux β -lactamines. Un peptidoglycane majoritairement réticulé par les LDT pourrait participer à la résistance intrinsèque des mycobactéries à cette classe d'antibiotique (en plus de la production de β -lactamases). En accord avec cette hypothèse, les carbapénèmes, qui inhibent les PBP et les LDT, sont des antibiotiques efficaces *in vivo* contre *M. tuberculosis* en association avec l'acide clavulanique et font partie des antibiotiques de 3^{ème} ligne pour le traitement des tuberculoses multirésistantes (Hugonnet et al. 2009).

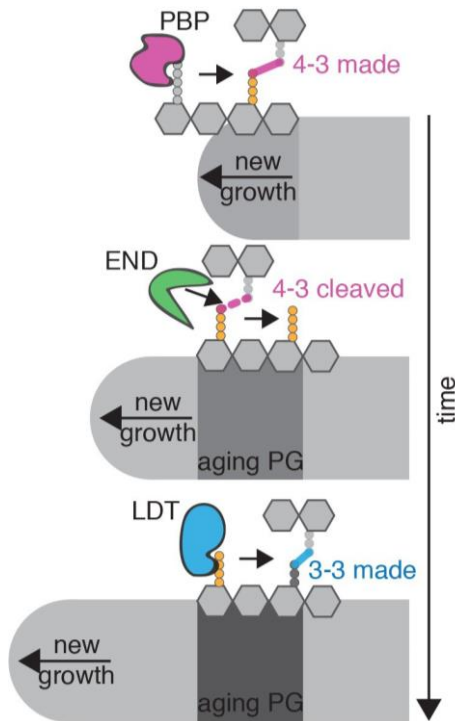


Figure 19. Modèle de maturation du peptidoglycane chez les mycobactéries.

La croissance des mycobactéries provient des pôles dans lesquels les nouvelles chaînes glycanes sont reliées entre elles par des ponts de type 4→3 formés par les PBP. Au cours de la croissance, ces ponts 4→3 sont hydrolysés par une endopeptidase. L'hydrolyse des ponts 4→3 libère des tiges tetrapeptides utilisées par les LDT pour former des ponts de type 3→3 et restaurer la fonction osmoprotectrice du peptidoglycane. Figure provenant de la référence (Baranowski et al. 2018).

***Caulobacter crescentus*.** Il existe deux LDT chez *Caulobacter crescentus*, LdtD et YkuD. *C. crescentus* a un cycle de vie dimorphique : une forme mobile avec un flagelle et une forme immobile adhérente à une surface par l'intermédiaire d'un pédoncule (Skerker and Laub 2004). Le pédoncule est une structure qui est une prolongation de l'enveloppe à un des deux pôles de la bactérie. Une étude récente a montré que ce pédoncule a la particularité d'avoir des ponts de type 3→3 dans son peptidoglycane, alors que le peptidoglycane du reste de la bactérie n'est constitué que de ponts 4→3 (Stankeviciute et al. 2019). Les auteurs de cette étude ont montré que LdtD est responsable de la formation des ponts 3→3 dans le pédoncule et que l'expression de *ldtD* augmente pendant l'élongation du pédoncule. L'absence de ponts 3→3 d'une souche $\Delta ldtD$ n'abolit pas la formation du pédoncule mais rend la souche plus sensible au lysozyme, suggérant que LdtD participe à la maturation et à la solidité du pédoncule.

2.5.2 Contournement des PBP par les L,D-transpeptidases

Résistance aux β -lactamines médiée par les L,D-transpeptidases chez *Enterococcus faecium*. Ldt_{fm} a été la première LDT découverte dans le cadre d'un projet qui consistait à identifier les mutations capables de

conférer la résistance à l'ampicilline chez *E. faecium* (Mainardi et al. 2000). Les auteurs ont utilisé la souche D344S, qui est sensible à l'ampicilline car elle porte la délétion du gène codant pour la PBP5 de faible affinité, afin d'identifier des mutations dans d'autres PBP qui pourraient conférer une résistance à l'ampicilline. Après cinq étapes de sélection sur des concentrations croissantes d'ampicilline, le mutant M512 a été obtenu. M512 a une CMI de l'ampicilline supérieure à 2000 µg/ml, contre 0,06 µg/ml pour la souche parentale D344S. L'étude de la structure du peptidoglycane du mutant M512 par chromatographie liquide à haute pression et spectrométrie de masse a révélé le remplacement total des ponts de type 4→3 par des ponts de type 3→3, qui ne représentaient que 0,7% du total des ponts dans la souche parentale D344S. L'étude ultérieure de la composition du peptidoglycane des mutants intermédiaires (M1 à M4) a révélé que l'augmentation de la CMI de l'ampicilline et le remplacement des ponts 4→3 par les ponts 3→3 étaient tous les deux progressifs (Figure 20) (Mainardi et al. 2002).

Souche	CMI amp (µg/ml)	Proportion de ponts en absence d'amp (%)		Proportion de ponts en présence d'amp (%)	
		4→3	3→3	4→3	3→3
D344S	0,06	96,9	3,1	75,0	25,0
M1	0,5	88,6	11,4	36,0	64,0
M2	1	88,1	11,9	33,0	67,0
M3	2	88,3	11,7	27,4	72,6
M4	128	71,3	28,7	28,5	71,5
M512	>2000	28,5	71,5	0,0	100

Figure 20. Proportions de ponts 4→3 et 3→3 dans les mutants résistants à l'ampicilline de D344S. Les concentrations d'ampicilline (amp) utilisées sont respectivement de 0,03 ; 0,12 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,5 et 1000 µg/ml pour les souches D344S, M1, M2, M3, M4 et M512. Les différentes valeurs proviennent de la référence (Mainardi et al. 2002).

A ce stade, les auteurs avaient identifié le contournement de l'activité D,D-transpeptidase par l'activité L,D-transpeptidase comme nouveau mécanisme de résistance aux β-lactamines. La LDT responsable de ce mécanisme de résistance, Ldt_{fm}, a par la suite été identifiée par génétique inverse (Mainardi et al. 2005). A partir d'extraits bruts de *E. faecium*, les auteurs ont partiellement purifié l'enzyme qui possédait une activité L,D-transpeptidase. Ils ont ensuite obtenu la séquence protéique de l'enzyme par séquençage N-terminal. Le gène codant pour cette enzyme a ensuite été identifié dans le génome de *E. faecium*, et la production de cette protéine chez *E. coli* a permis de démontrer pour la première fois l'activité L,D-transpeptidase d'une protéine, Ldt_{fm}.

Après l'identification de Ldt_{fm}, les éléments nécessaires à l'activation du mécanisme de résistance aux β-lactamines médiée par Ldt_{fm} ont été recherchés. L'activité L,D-transpeptidase était détectée dans des

extraits membranaires de la souche parentale D344S, indiquant que Ldt_{fm} était déjà produite dans la souche parentale bien qu'elle ne contribuait qu'à la formation de 3% du total des ponts du peptidoglycane. Une activité D,D-carboxypeptidase insensible à l'ampicilline a été détectée dans les extraits membranaires des mutants M4 et M512. Cette activité D,D-carboxypeptidase permettrait de fournir le substrat tetrapeptide essentiel à l'activité de Ldt_{fm}. En adéquation avec cette hypothèse, la quantité d'UDP-MurNAc-tetrapeptides dans les mutants M4 et M512 avait fortement augmenté, suggérant que l'activité D,D-carboxypeptidase identifiée était cytoplasmique. Cette D,D-carboxypeptidase insensible à l'ampicilline a par la suite été identifiée et caractérisée *in vitro* (Sacco et al. 2010). Il s'agit de la métallo-D,D-carboxypeptidase DdcY, homologue de VanY nécessaire pour la résistance à la vancomycine chez les entérocoques (Arthur et al. 1999). L'expression de *ddcY* est contrôlée par un système à deux composants DdcR/DdcS, et la surproduction de DdcY dans la souche M512 provient de la substitution T161A dans le senseur DdcS qui abolit son activité phosphatase (Sacco et al. 2010). L'augmentation de l'activité D,D-carboxypeptidase cytoplasmique est nécessaire mais pas suffisante pour le contournement des PBP par Ldt_{fm}, car l'expression ectopique de *ddcY* ne conférait pas la résistance à l'ampicilline à la souche parentale D344S mais augmentait le niveau de résistance du mutant M1 (Mainardi et al. 2002; Sacco et al. 2014). M1 possède une mutation dans un opéron qui contient les gènes *stpA* et *stkA*, qui encodent respectivement une sérine-thréonine protéine phosphatase et une sérine-thréonine protéine kinase. La mutation retrouvée chez le mutant M1 inactive complètement la phosphatase StpA grâce à la substitution T101R, induisant une hyperphosphorylation de plusieurs protéines par StkA. Par conséquent, la résistance aux β-lactamines médiée par le contournement des PBP par Ldt_{fm} chez *E. faecium* nécessite deux facteurs essentiels : (i) la surproduction de la D,D-carboxypeptidase cytoplasmique DdcY, qui fournit le substrat tetrapeptide de Ldt_{fm}, et (ii) une hyperphosphorylation de certaines protéines par la kinase StkA (Figure 21) (Sacco et al. 2015). L'identification des protéines phosphorylées par StkA qui activent ce mécanisme de résistance est actuellement en cours au laboratoire.

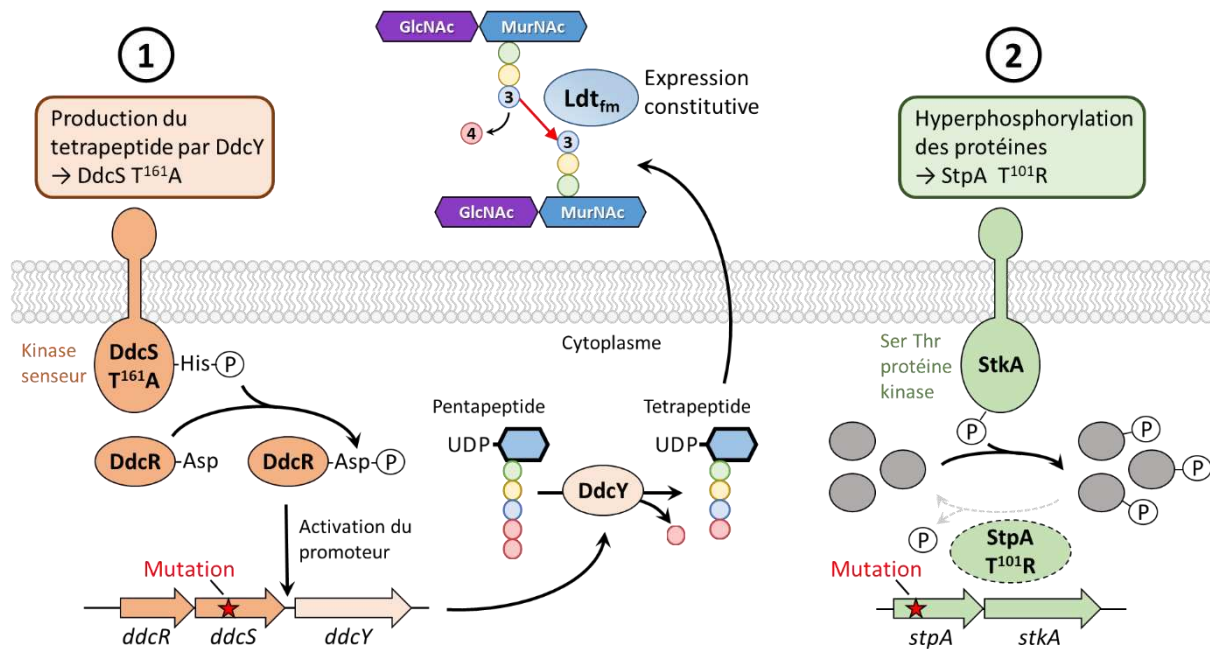


Figure 21. Résistance aux β -lactamines médiée par Ldt_{fm} chez *Enterococcus faecium*.

Ce mécanisme de résistance chez *E. faecium* nécessite deux évènements mutationnels. La première mutation (1) entraîne la production de DdcS T161A qui s'autophosphoryle et transfère le groupement phosphate à DdcR qui induit l'expression de DdcY. La D,D-carboxypeptidase cytoplasmique DdcY fournit le substrat tetrapeptide à Ldt_{fm} constitutivement exprimée. Le pont 3→3 formé par Ldt_{fm} relie la Lys en position 3 de la tige donneuse au résidu Asp ou Asn porté par la Lys en position 3 de la tige accepteuse. La seconde mutation (2) entraîne la production de la phosphatase StpA T101R inactive, entraînant une hyperphosphorylation des protéines par l'activité de la kinase StkA. Les protéines hyperphosphorylées par StkA nécessaires à l'activation du mécanisme de résistance sont inconnues.

Résistance aux β -lactamines médiée par les L,D-transpeptidases chez *Escherichia coli*. En 2016, le laboratoire a montré que la résistance aux β -lactamines médiée par les LDT était également possible chez *E. coli* (Hugonnet et al. 2016). Dans cette étude, le laboratoire a montré que la surexpression ectopique du gène *ycbB* codant pour une LDT ne suffisait pas pour conférer la résistance aux β -lactamines. D'une façon similaire à *E. faecium*, il faut des facteurs supplémentaires pour activer le mécanisme de résistance. Les auteurs ont montré que la surexpression du gène *ycbB* permettait néanmoins la sélection de mutants résistants à de fortes concentrations d'ampicilline, alors qu'en absence de YcbB aucun mutant n'était sélectionné. La même expérience a été réalisée pour la deuxième LDT de *E. coli* qui catalyse la formation de ponts de type 3→3, YnhG, mais cette LDT n'est pas capable de contourner l'activité des PBP comme le fait YcbB. Les mutants résistants à l'ampicilline surproduisant YcbB présentaient une quasi-totalité de ponts 3→3 dans leur peptidoglycane lorsqu'ils étaient cultivés en présence d'ampicilline. Les auteurs ont également purifié YcbB et démontré son activité L,D-transpeptidase *in vitro* pour la première fois.

Les auteurs ont ensuite cherché par une approche gène candidat les partenaires fonctionnels de YcbB dans la synthèse du peptidoglycane. Ils ont pour cela réalisé les mêmes expériences de sélection de mutants en surexprimant *ycbB* dans différentes souches portant la délétion d'un gène codant pour un partenaire potentiel de YcbB. Par cette approche, les auteurs ont démontré que l'apparition de mutants résistant à l'ampicilline n'était pas possible en absence de la PBP5, de la PBP1b et de sa lipoprotéine associée LpoB. Des sélections de mutants supplémentaires dans des souches possédant des allèles codant pour des versions inactivées de PBP1b dans l'un des deux domaines ont permis de démontrer que c'est l'activité glycosyltransférase de PBP1b et pas l'activité D,D-transpeptidase qui était nécessaire pour le mécanisme de résistance. Le modèle proposé suggère que PBP1b synthétise de nouvelles chaînes glycanes, que les tiges pentapeptides sont ensuite converties en tiges tetrapeptides par la PBP5, et ces tiges tetrapeptides sont utilisées comme substrats par la LDT YcbB qui reliera les chaînes glycanes entre elles. Cette expérience présente cependant des limites car d'une part il y a de nombreux gènes impliqués dans la synthèse et la dégradation du peptidoglycane (et ils n'ont donc pas tous été testés), et d'autre part beaucoup de ces gènes sont essentiels à la croissance bactérienne et ne peuvent donc pas être testés par cette approche.

Les auteurs ont ensuite essayé d'identifier les mutations chromosomiques capables d'activer le mécanisme de résistance lorsque YcbB est surproduite. Le séquençage de sept mutants indépendants a permis l'identification de sept mutations différentes dans les gènes codant pour des aminoacyl-ARNt synthétases. Les auteurs ont supposé que ces mutations pourraient diminuer l'activité ou le niveau d'expression de ces enzymes, mimant alors une carence en acide aminés et déclenchant la production de l'alarmone (p)ppGpp par l'enzyme RelA. La production de (p)ppGpp et ses effets sont réunis sous le terme de réponse stringente, qui sera détaillée dans le chapitre 3. En exprimant un allèle tronqué du gène *relA* codant pour l'enzyme RelA' qui synthétise de façon constitutive du (p)ppGpp, les auteurs ont confirmé que c'est bien la production de cette alarmone qui active le mécanisme de résistance. Par conséquent, la résistance aux β -lactamines médiée par le contournement des PBP par YcbB chez *E. coli* nécessite deux facteurs essentiels : (i) la surproduction de la LDT YcbB, qui fonctionne avec l'activité glycosyltransférase de la PBP1b et l'activité D,D-carboxypeptidase de la PBP5, et (ii) une surproduction de l'alarmone (p)ppGpp (Figure 22).

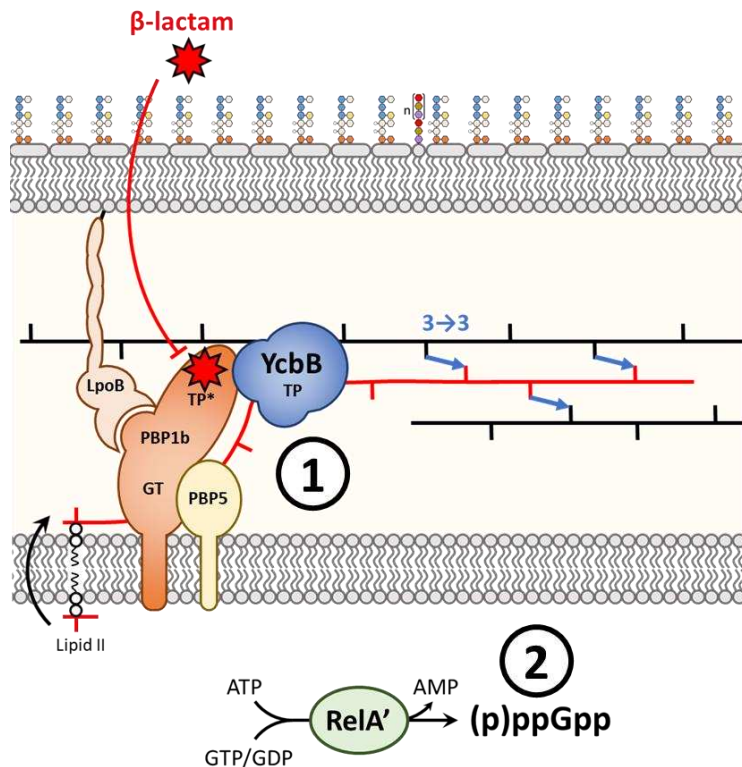


Figure 22. Résistance aux β -lactamines médiée par YcbB chez *Escherichia coli*.

Ce mécanisme de résistance chez *E. coli* nécessite deux principaux éléments. Le premier élément (1) est la surproduction de la LDT YcbB. L'expression native de YcbB n'est pas suffisante pour conférer la résistance aux β -lactamines. La surproduction de YcbB est possible grâce au plasmide pKT2(*ycbB*) qui porte le gène *ycbB* sous contrôle d'un promoteur inducible par l'IPTG. YcbB assure l'activité de transpeptidation (TP). Le second élément (2) est la production de l'alarmone (p)ppGpp. La production de (p)ppGpp peut venir de mutations chromosomiques qui miment une carence en acide aminés, ou par la production de l'enzyme RelA' grâce au plasmide pKT8(*relA'*) qui porte le gène *relA'* sous contrôle d'un promoteur inducible par le L-arabinose. L'activité glycosyltransférase (GT) de PBP1b, sa lipoprotéine LpoB ainsi que la D,D-carboxypeptidase PBP5 sont essentielles au contournement des PBP par YcbB.

Bien que les deux mécanismes de résistance aux β -lactamines présentés dans ce chapitre sont possibles grâce au contournement des PBP par des LDT, les différences entre *E. faecium* et *E. coli* sont frappantes. Tout d'abord, Ldt_{fm} de *E. faecium* est constitutivement produite en quantité suffisante pour conférer la résistance, alors que *E. coli* a besoin de surproduire YcbB. A l'inverse, pour fournir les substrats tetrapeptides des LDT *E. faecium* nécessite la surproduction de la D,D-carboxypeptidase cytoplasmique DdcY alors que *E. coli* utilise la D,D-carboxypeptidase périplasmique PBP5 constitutivement produite en quantité suffisante. Enfin, pour activer le mécanisme de résistance, les deux espèces nécessitent un évènement distinct aux effets pléiotropes : *E. faecium* nécessite une hyperphosphorylation des protéines alors que *E. coli* nécessite la production de l'alarmone (p)ppGpp. La résistance aux β -lactamines médiée par le contournement des PBP par les LDT est donc possible dans des espèces aussi éloignées que *E.*

faecium et *E. coli*, ce qui suggère qu'un tel mécanisme de résistance pourrait également être possible dans d'autres espèces bactériennes.

3. La réponse stringente

3.1 (p)ppGpp : synthèse, dégradation et régulation

Lorsque les bactéries rencontrent des conditions environnementales qui limitent leur croissance, elles déclenchent la synthèse de guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) et de guanosine 5'-triphosphate 3'-diphosphate (pppGpp), réunies sous le terme (p)ppGpp. Ce processus déclenche une réponse pléiotrope complexe dénommée la réponse stringente (le mot « stringente » est un anglicisme qui provient de « stringent » qui devrait normalement se traduire par « stricte »). La production de (p)ppGpp a été identifiée pour la première fois il y a plus de 50 ans en réponse à une carence en acides aminés (Cashel and Gallant 1969). Les auteurs de cette étude ont observé l'effet d'une carence en acide aminés sur la quantité de nucléotides marqués au phosphore 32 en réalisant des autoradiographies sur des gels en deux dimensions de métabolites extraits à l'acide formique. Ils se sont aperçus que la carence en acides aminés induisait une diminution de la quantité de nucléotides et l'apparition d'une nouvelle tâche constituée de deux petites tâches chevauchantes et qui migraient très peu dans le gel. Les auteurs ont nommé cette tâche le « magic spot » et c'est aujourd'hui un terme récurrent pour désigner le (p)ppGpp. Aujourd'hui de nombreux laboratoires étudient les effets de la réponse stringente ainsi que les différents stress environnementaux capables de la déclencher. Les enzymes de la superfamille RSH (RelA/SpoT Homologue) sont responsables de la synthèse et de la dégradation du (p)ppGpp. Le (p)ppGpp se fixe à de nombreuses enzymes et les cibles peuvent être communes à différentes espèces bactériennes ou spécifiques à certaines d'entre elles.

Synthèse et dégradation du (p)ppGpp. La synthèse du (p)ppGpp nécessite le transfert d'un pyrophosphate d'une molécule d'ATP sur le groupement 3'-OH du ribose d'une molécule de GTP ou de GDP (Figure 23). Ce transfert se produit par l'attaque nucléophile du groupement 3'-OH du ribose sur le phosphate β de l'ATP (Steinchen et al. 2015). La dégradation du (p)ppGpp se produit par l'hydrolyse du groupement pyrophosphate, reformant ainsi une molécule de GTP ou de GDP (Sy 1977). Il y a trois groupes d'enzymes RSH : les longues RSH bifonctionnelles, les petites synthases SAS (pour « Small Alarmone Synthetases » en anglais) et les petites hydrolases SAH (pour « Small Alarmone Hydrolyases » en anglais). Les longues RSH

sont présentes chez les bactéries et dans les chloroplastes des plantes et des algues vertes (Atkinson, Tenson, and Haurlyuk 2011; Jimmy et al. 2020; Takahashi, Kasai, and Ochi 2004). Les longues RSH possèdent plusieurs domaines répartis entre la région enzymatique N-ter et la région régulatrice C-ter. La région N-ter possède un domaine synthase et un domaine hydrolase, alors que la région C-ter possède des domaines impliqués dans la régulation des activités enzymatiques et dans des interactions protéines-protéines. Les domaines de synthèse et d'hydrolyse maintiennent un niveau de (p)ppGpp optimal en fonction des conditions de croissance (Hogg et al. 2004). Une accumulation de (p)ppGpp peut être toxique et le domaine hydrolase permet d'éviter cette accumulation. *E. coli* et la plupart des bactéries appartenant aux classes des *Betaproteobacteria* et des *Gammaproteobacteria* possèdent deux longues RSH, les enzymes RelA et SpoT (Atkinson et al. 2011). Les bactéries appartenant aux autres classes possèdent généralement une longue RSH bifonctionnelle, Rel, ainsi que des SAS et SAH. RelA est monofonctionnelle à cause de mutations dans le site actif du domaine hydrolase alors que SpoT est bifonctionnelle (Aravind and Koonin 1998). Une étude a montré que RelA utilise préférentiellement le GDP pour former du ppGpp et SpoT utilise préférentiellement le GTP pour former du pppGpp (Sajish et al. 2009). Les auteurs de cette étude ont également montré que RelA était capable de synthétiser en faible quantité du pGpp à partir de GMP mais la fonction de cette molécule est inconnue. Chez *E. coli* il existe également une troisième enzyme impliquée dans le métabolisme du (p)ppGpp mais qui n'appartient pas à la famille RSH. Cette enzyme, GppA, hydrolyse le phosphate gamma en 5' du ribose d'une molécule de pppGpp et forme ainsi du ppGpp (Hara and Sy 1983; Keasling, Bertsch, and Kornberg 1993). Les SAS et les SAH, absentes chez *E. coli*, ne contiennent respectivement qu'un domaine synthase et hydrolase du (p)ppGpp. Ces enzymes sont généralement dépourvues de domaine régulateur et leur activité est régulée au niveau transcriptionnel en réponse à différents stress tels que la présence d'antibiotiques, d'éthanol ou d'un pH alcalin (Abranches et al. 2009; Geiger et al. 2014; Nanamiya et al. 2008; Pando et al. 2017). RelZ est une SAS particulière de *Mycobacterium smegmatis* qui possède un domaine RNase impliqué dans la séparation des R-loops (hybrides ADN-ARN), démontrant que les RSH peuvent avoir d'autres fonctions enzymatiques et suggérant un rôle du (p)ppGpp dans la réparation de l'ADN (Krishnan et al. 2016; Murdeshwar and Chatterji 2012).

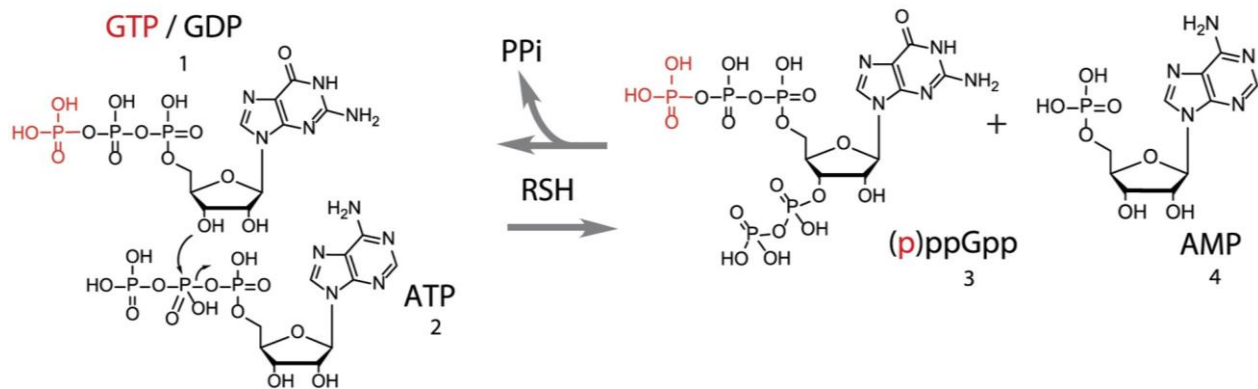


Figure 23. Schéma de synthèse et de dégradation du (p)ppGpp.

Les enzymes RSH utilisent une molécule de GTP/GDP (1) et d'une molécule d'ATP (2) pour former le (p)ppGpp (3) et de l'AMP (4). Les RSH sont également capables d'hydrolyser le (p)ppGpp pour reformer du GTP ou du GDP en libérant un pyrophosphate (PPi). Figure provenant de la référence (Beljantseva et al. 2017).

Régulation de RelA et SpoT. Les enzymes RelA et Rel interagissent avec les ribosomes qui régulent leurs activités. Lorsque RelA ou Rel ne sont pas liées aux ribosomes, elles sont dans une conformation qui favorise l'hydrolyse du (p)ppGpp (conformation sans activité pour RelA), et lorsqu'elles se lient aux ribosomes elles sont dans une conformation qui favorise la synthèse de (p)ppGpp (Arenz et al. 2016; Brown et al. 2016; Gratani et al. 2018; Loveland et al. 2016). L'absence d'ARNt chargé suite à une carence en acides aminés va stabiliser l'interaction entre RelA ou Rel avec le ribosome et permettre la synthèse de (p)ppGpp (Kudrin et al. 2018). Le (p)ppGpp se fixe à RelA sur le complexe RelA-ribosome et stimule aussi sa propre synthèse (Shyp et al. 2012). SpoT est la seule enzyme avec une activité hydrolase du (p)ppGpp chez *E. coli*. SpoT est par conséquent cruciale pour (i) éviter la toxicité induite par l'accumulation de (p)ppGpp et (ii) maintenir le niveau intracellulaire basal de (p)ppGpp (Sarubbi, Rudd, and Cashel 1988; Xiao et al. 1991). SpoT est capable d'augmenter ou de diminuer la concentration intracellulaire de (p)ppGpp en interagissant avec plusieurs protéines. En réponse à une carence en source de carbone ou en phosphate, la protéine YtfK est surproduite et se fixe à SpoT pour stimuler son activité synthase (Germain et al. 2019; Meyer, Germain, and Maisonneuve 2021; Spira, Silberstein, and Yagil 1995). Toujours dans le cas d'une carence en source de carbone, la protéine Rsd est capable de stimuler l'activité hydrolase de SpoT afin d'éviter une trop forte accumulation de (p)ppGpp (J. W. Lee, Park, and Seok 2018). En réponse à une carence en acide gras, les protéines porteuses d'acyle non chargées vont interagir avec SpoT et induire une augmentation de la quantité de (p)ppGpp (Battesti and Bouveret 2006; Seyfzadeh, Keener, and Nomura 1993). Enfin, une accumulation de (p)ppGpp dépendante de SpoT a également été observée en réponse à une carence en fer mais le mécanisme activateur de cette accumulation n'est pas connu (Vinella et al. 2005).

3.2 Effets du (p)ppGpp

Le (p)ppGpp a des effets pléiotropes qui permettent l'adaptation à des conditions de croissance non favorables. Le (p)ppGpp est capable de se fixer directement à plusieurs enzymes et de réguler leurs activités (Zhang et al. 2018). Ces effets directs sont variés et touchent des enzymes impliquées dans plusieurs voies métaboliques comme la synthèse des nucléotides, la réplication de l'ADN ou encore la maturation des ribosomes. Le ppGpp et le pppGpp sont respectivement de meilleurs régulateurs d'enzymes chez *E. coli* et *B. subtilis* (Maciag et al. 2010; Mechold et al. 2013; Wang, Sanders, and Grossman 2007). Par conséquent, la concentration de ppGpp est plus importante que celle de pppGpp chez *E. coli* (grâce à l'activité de GppA notamment), alors que c'est l'inverse chez *Bacillus subtilis* (Keasling et al. 1993; Samarraï et al. 2011). Cette simple différence entre *E. coli* et *B. subtilis* reflète la variabilité de la réponse stringente chez les différentes espèces de bactéries. La régulation directe de l'activité de certaines enzymes par le (p)ppGpp va également entraîner des effets indirects sur l'expression de nombreux gènes (Geiger and Wolz 2014; Sanchez-Vazquez et al. 2019). Ces effets indirects sont essentiels pour l'adaptation des bactéries aux conditions environnementales déclenchant la réponse stringente.

Effets du (p)ppGpp sur la transcription. Chez les *Proteobacteria*, le (p)ppGpp est capable de se fixer à l'ARN polymérase (RNAP) et de moduler son activité. Une étude récente a montré par RNA-seq que la fixation du (p)ppGpp à la RNAP modifie le niveau d'expression de près de 30% des gènes de *E. coli* (Sanchez-Vazquez et al. 2019). Les auteurs de cette étude ont montré qu'il n'y a presque pas de changement d'expression des gènes si la RNAP est incapable de fixer le (p)ppGpp, démontrant que la quasi-totalité de la régulation transcriptionnelle de la réponse stringente passe par l'interaction entre le (p)ppGpp et la RNAP. Il existe deux sites de fixation du (p)ppGpp sur la RNAP (Ross et al. 2016). Le site 1 est localisé à l'interface entre les sous-unités β' et ω (respectivement encodées par les gènes *rpoC* et *rpoZ*). Le site 2 est localisé à l'interface entre la sous-unité β' et le régulateur transcriptionnel DksA. Le phénotype d'une souche (p)ppGpp⁰ ($\Delta reIA \Delta spoT$) ressemble fortement à celui d'une souche $\Delta dksA$, suggérant que la fixation du (p)ppGpp au site 2 de la RNAP est responsable de la majorité des effets de la réponse stringente chez *E. coli*. En se fixant à la RNAP, le (p)ppGpp déstabilise les complexes ouverts de transcription des promoteurs instables (riches en GC entre le -10 et le +1) qui contrôlent l'expression des ARN ribosomiaux et des ARN de transferts (Barker et al. 2001; Haugen et al. 2006; Reiness et al. 1975). En se fixant dans le canal secondaire de la RNAP, DksA interfère avec le positionnement des ribonucléotides dans le site actif de la RNAP et diminue également la stabilité des complexes ouverts de transcription dans les promoteurs

instables des ARNr et ARNt (Doniselli et al. 2015). Par conséquent, le (p)ppGpp et DksA fonctionnent en synergie pour diminuer la quantité d'ARNr et d'ARNt et *in fine* la quantité de ribosomes et de protéines (Molodtsov et al. 2018; Paul et al. 2004). En plus de diminuer la transcription des ARNr et ARNt, le (p)ppGpp et DksA diminuent également l'expression des gènes codant pour les protéines ribosomales (Lemke et al. 2011). Cette forte diminution de ribosomes en situation de carence assure à la bactérie une énorme économie d'énergie. En déstabilisant les complexes ouverts des promoteurs instables reconnus par le facteur sigma végétatif σ^{70} et en modulant l'affinité de la RNAP pour les différents facteurs sigma, le (p)ppGpp et DksA favorisent également le recrutement de facteurs sigma alternatifs et contribuent à augmenter le niveau d'expression des gènes impliqués dans les réponses aux stress (Jishage et al. 2002; Mauri and Klumpp 2014; Sharma and Chatterji 2010). Le (p)ppGpp et DksA sont également impliqués dans l'augmentation du niveau d'expression des gènes de biosynthèse des acides aminés qui sont sous contrôle de promoteurs stables (riches en AT entre le -10 et le +1) (Barker et al. 2001; Paul, Berkmen, and Gourse 2005; Traxler et al. 2008). Chez les *Firmicutes* et les *Actinobacteria*, le (p)ppGpp ne se fixe pas à la RNAP mais exerce tout de même une régulation transcriptionnelle indirecte sur plusieurs gènes. Chez *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* par exemple, les quatre premiers nucléotides nécessaires à la transcription des ARNr sont généralement des GTP (Kästle et al. 2015; Krásny and Gourse 2004). En inhibant directement les enzymes impliquées dans la synthèse du GTP (voir plus bas), le (p)ppGpp permet de diminuer indirectement l'initiation de la transcription des ARNr. De plus, chez les *Firmicutes* le répresseur transcriptionnel CodY réprime l'expression de plus d'une centaine de gènes lorsque la concentration intracellulaire en GTP est élevée (Geiger and Wolz 2014; Sonenshein 2005). L'inhibition de la synthèse du GTP par le (p)ppGpp permet donc de lever la répression de CodY et d'induire l'expression des gènes de ce régulon.

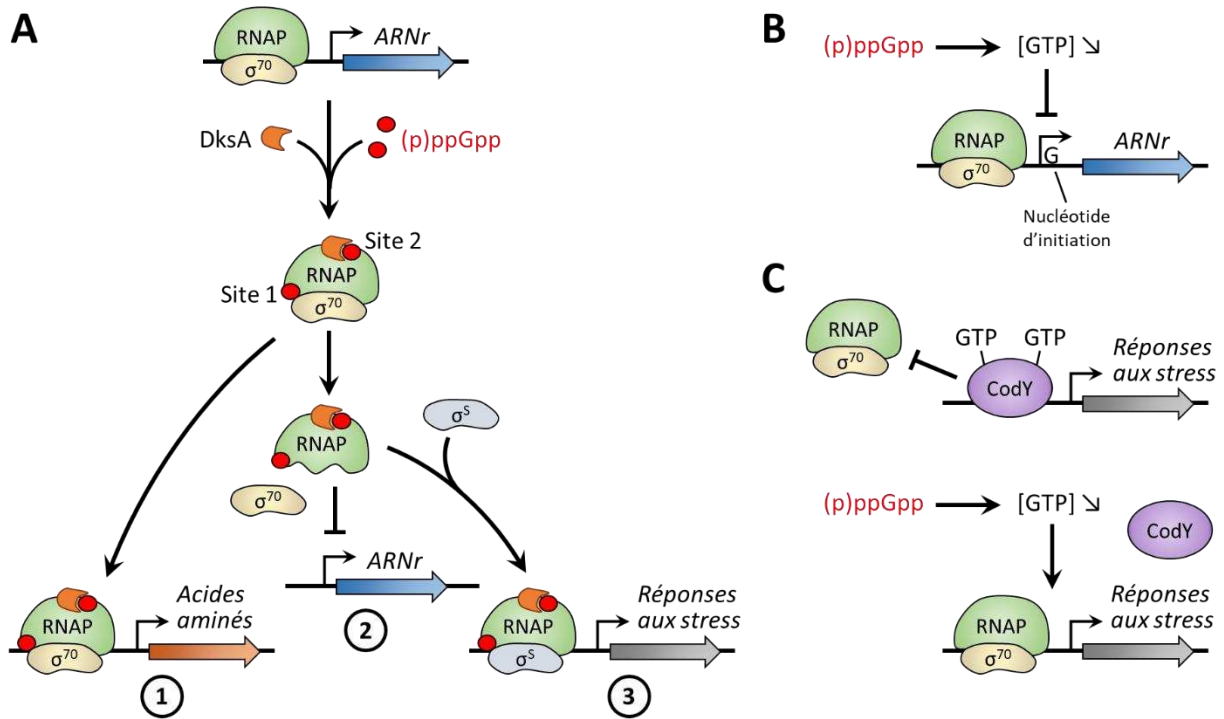


Figure 24. Effet indirects du (p)ppGpp sur l'expression des gènes.

(A) Chez les *Proteobacteria*, le (p)ppGpp se fixe à l'ARN polymérase (RNAP) avec le régulateur transcriptionnel DksA. La fixation du (p)ppGpp et de DksA à la RNAP augmente le niveau d'expression des gènes de biosynthèse des acides aminés (1), diminue l'expression des ARNr et ARNt (2), et augmente la disponibilité de la RNAP pour les facteurs sigma alternatifs et augmente le niveau d'expression des gènes dépendant de ces facteurs sigma (3). (B) Chez les *Firmicutes* et les *Actinobacteria*, le (p)ppGpp diminue la concentration en GTP ce qui empêche la transcription des ARNr et ARNt qui dépendent d'une ou de plusieurs molécules de GTP pour initier la transcription. (C) Chez les *Firmicutes*, lorsque les concentrations en GTP sont élevées le répresseur transcriptionnel CodY empêche la fixation de la RNAP sur certains promoteurs. En diminuant la concentration en GTP, le (p)ppGpp lève la répression et permet l'expression des gènes du régulon CodY.

Effets du (p)ppGpp sur la synthèse des nucléotides. La synthèse d'une molécule de (p)ppGpp consomme une molécule d'ATP et une molécule de GTP ou de GDP. Par conséquent, la synthèse du (p)ppGpp participe *per se* à la diminution de la quantité intracellulaire de ces trois nucléotides. Le (p)ppGpp est également capable d'inhiber directement des enzymes impliquées dans la voie de synthèse *de novo* et dans le recyclage des purines (Figure 25) (Gallant, Irr, and Cashel 1971). L'inhibition de la synthèse *de novo* des purines passe par la fixation du (p)ppGpp à PurF, inhibant ainsi la conversion du PRPP en IMP (Wang et al. 2019). Le (p)ppGpp impacte aussi les étapes suivantes en inhibant l'enzyme PurA impliquée dans la synthèse de l'ATP à partir de l'IMP ainsi que les enzymes GuaB et Gmk impliquées dans la synthèse du GTP à partir de l'IMP (Hou et al. 1999; Kriel et al. 2012; Liu et al. 2015). GuaB et Gmk sont respectivement faiblement inhibées par le (p)ppGpp chez *B. subtilis* et *E. coli*. L'inhibition de la voie de recyclage des

purines chez *E. coli* passe par l'inhibition de l'enzyme Gsk qui convertit respectivement l'inosine et la guanosine en IMP et GMP (Wang, Grant, and Laub 2020). Le (p)ppGpp inhibe également l'enzyme Hpt qui convertit respectivement l'hypoxanthine et la guanine en IMP et en GMP, ainsi que l'enzyme Gpt qui convertit la xanthine en XMP (Hochstadt-Ozer and Cashel 1972; Zhang et al. 2018). Enfin, le (p)ppGpp participe directement à la dégradation des nucléotides en se fixant à la nucléotide 5'-monophosphate nucléosidase PpnN et en stimulant son activité enzymatique (Zhang et al. 2019). L'inhibition directe des enzymes impliquées dans la synthèse des purines a des effets indirects sur la réplication, la transcription et la traduction.

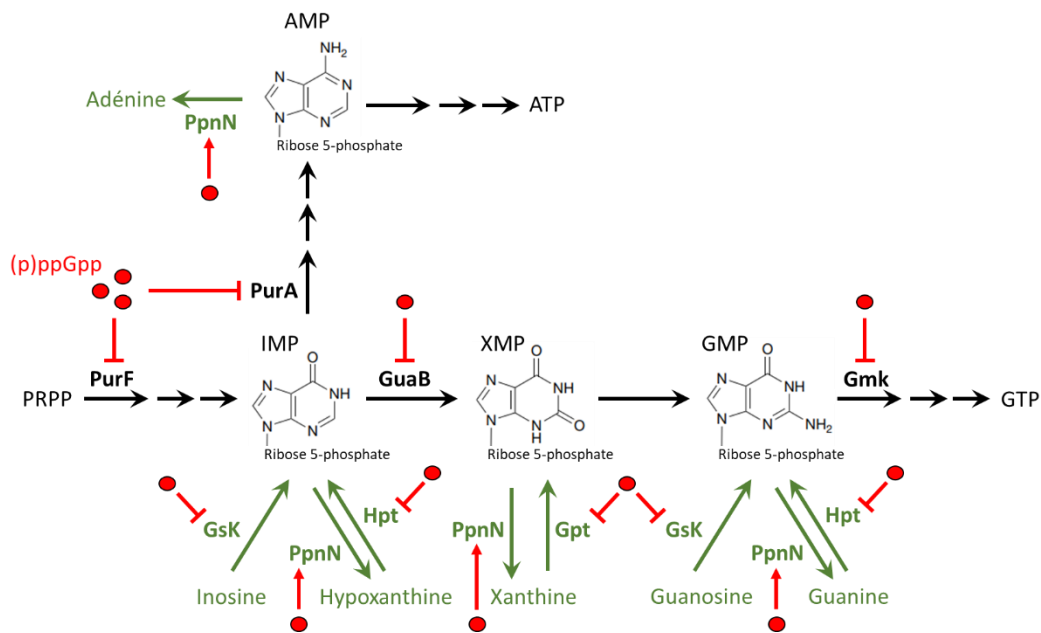


Figure 25. Effets du (p)ppGpp sur la synthèse des nucléotides.

Le (p)ppGpp inhibe directement plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse des nucléotides puriques. La voie de synthèse *de novo* est représentée en noir et la voie de recyclage en vert. Abréviations : PRPP, 5'-phosphoribosyl-1-pyrophosphate ; IMP, inosine 5'-monophosphate ; XMP, xanthine 5'-monophosphate ; GMP/GTP, guanosine 5'-mono/triphosphate ; AMP/ATP, adénosine 5'-mono/triphosphate.

Effets du (p)ppGpp sur la réplication de l'ADN. La réplication de l'ADN est inversement proportionnelle à la quantité intracellulaire de (p)ppGpp (Ferullo and Lovett 2008; Schreiber, Ron, and Glaser 1995). Le (p)ppGpp régule la réplication de l'ADN au niveau de l'initiation et de l'élongation. L'initiation de la réplication nécessite l'ATPase DnaA qui se fixe à l'origine de réplication du chromosome *oriC* lorsque celle-ci est négativement surenroulée (Magnan and Bates 2015). En se fixant à la RNAP, le (p)ppGpp empêche la reconnaissance d'un des deux promoteurs de *dnaA* et diminue le niveau d'expression de ce gène (Chiaramello and Zyskind 1990; Riber and Løbner-Olesen 2020). De plus, le (p)ppGpp diminue le niveau de

surenroulement négatif de l'ADN et diminue la reconnaissance de *oriC* par DnaA (Kraemer, Sanderlin, and Laub 2019). Le mécanisme aboutissant à la diminution du surenroulement négatif de l'ADN par le (p)ppGpp n'est pas encore déterminé et pourrait provenir de la diminution du niveau global de transcription ou de la régulation transcriptionnelle ou enzymatique de gyrases et topoisomérases. L'élongation de l'ADN nécessite la primase DnaG qui synthétise les amorces ARN utilisées pour former les fragments d'Okazaki pendant la réplication du brin retardé (le « lagging strand » en anglais) (Rowen and Kornberg 1978). Le (p)ppGpp diminue la vitesse d'élongation de l'ADN en inhibant directement la primase DnaG (Maciag et al. 2010; Wang et al. 2007).

Effets du (p)ppGpp sur les ribosomes. En plus de l'effet du (p)ppGpp sur la transcription des ARNr, le (p)ppGpp diminue davantage la quantité de ribosomes en inhibant les GTPases ObgE, RsgA et Era impliquées dans la maturation des sous-unités 30S et 50S et en augmentant l'expression des gènes *hpf*, *rmf* et *raiA* impliqués dans l'hibernation des ribosomes (Corrigan et al. 2016; Feng et al. 2014; Izutsu, Wada, and Wada 2001; Zhang et al. 2018) [voir (Prossliner et al. 2018) pour une revue sur l'hibernation des ribosomes]. Le (p)ppGpp diminue également l'initiation, l'élongation et la terminaison de la traduction en inhibant les GTPases associées aux ribosomes. Par compétition avec le GTP, le (p)ppGpp inhibe les facteurs d'initiation IF2, d'élongation EF-Tu et EF-G et de relargage RF3 (Kihira et al. 2012; Milon et al. 2006; Rojas et al. 1984). IF2 s'associe à la sous-unité 30S et à un ARNt-fMet pour recruter la sous-unité 50S et ainsi former le ribosome 70S, EF-Tu apporte les ARNt-aminoacylés aux ribosomes, EF-G assure la translocation de la chaîne peptidique en cours d'élongation, et RF3 permet le relargage du peptide et le désassemblage du ribosome 70S [voir (Rodnina 2018) pour une revue sur la traduction].

Effets du (p)ppGpp sur la synthèse des lipides. Pour éviter une augmentation incontrôlée du volume cytoplasmique qui dépasserait la capacité des membranes, le (p)ppGpp est produit en réponse à une carence en acides gras (Vadia et al. 2017). En plus de la synthèse de (p)ppGpp induite par SpoT et les protéines porteuses d'acyles non chargés, une carence en acides gras entraîne également une diminution de la quantité de lysine qui déclenche la synthèse de (p)ppGpp par RelA (Battesti and Bouveret 2006; Sinha et al. 2019). L'inhibition de la synthèse des phospholipides ou du LPS de la membrane externe de *E. coli* induit également la production de (p)ppGpp, et l'alarme évite la lyse en faisant entrer les bactéries dans un état de semi-dormance (Roghianian et al. 2019). Le (p)ppGpp régule l'activité d'enzymes et l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des lipides. Le (p)ppGpp diminue l'expression du gène *plsB* qui code pour l'enzyme responsable de la première étape de synthèse des phospholipides, et des gènes *fabABHDG* qui codent pour les enzymes responsables de la synthèse des acides gras (My et al. 2013; Podkovyrov and

Larson 1996; Wahl et al. 2011). Le (p)ppGpp inhibe directement les activités de FabA et FabZ responsables de l'élongation des chaînes d'acide gras, de l'acétyl-CoA carboxyltransférase (composée des protéines AccA et AccD) nécessaire à la formation de malonyl-CoA utilisé par les protéines porteuses d'acyles, et de PgsA responsable de la synthèse des phosphatidylglycérols et des cardiolipines (Merlie and Pizer 1973; Polakis, Guchhait, and Lane 1973; Stein and Bloch 1976).

Effets du (p)ppGpp sur la réparation de l'ADN. Des études datant du début des années 2000 ont montré un lien entre la réponse stringente et la réparation de l'ADN (McGlynn and Lloyd 2000; Trautinger et al. 2005; Trautinger and Lloyd 2002). Ces études ont notamment montré que l'absence de production de (p)ppGpp augmente davantage la sensibilité aux radiations UV d'une souche portant les délétions des gènes *ruvABC* (codant pour des protéines nécessaires à la résolution des jonctions Holliday formées par les événements de recombinaisons homologues). Des mutations dans *spoT* entraînant une forte production de (p)ppGpp, ou des mutations dans le gène *rpoB* (codant pour la sous-unité β de la RNAP) mimant les effets de la fixation du (p)ppGpp à la RNAP sont capables de diminuer la sensibilité aux UV des mutants *ruvABC*. Lorsque la RNAP est bloquée par une lésion de l'ADN, deux mécanismes indépendants existent pour réparer l'ADN. Ce processus de couplage entre transcription et réparation de l'ADN se nomme TCR pour « Transcription-Coupled DNA Repair » en anglais. (i) La protéine Mfd est capable de pousser la RNAP et de la dissocier de l'ADN pour pouvoir recruter les enzymes de réparation de l'ADN UvrAB (Selby and Sancar 1993). (ii) L'hélicase UvrD est capable de faire reculer la RNAP (action de « backtracking » en anglais) et de recruter les enzymes de réparation de l'ADN UvrAB (Kamarthapu et al. 2016). Les auteurs de cette dernière étude proposent qu'en diminuant l'initiation de la transcription et le nombre de ribosomes, le (p)ppGpp est capable d'améliorer le TCR en favorisant le recul UvrD-dépendant de la RNAP. Dans les opérons fortement transcrits comme ceux des ARNr, la RNAP est incapable de reculer lorsqu'elle rencontre une lésion de l'ADN car d'autres RNAP en amont encombrant l'ADN. En diminuant l'initiation de la transcription, le (p)ppGpp favorise le recul de la RNAP sur les opérons fortement transcrits. De plus, le couplage transcription-traduction chez *E. coli* peut impliquer une forte concentration de ribosomes sur certaines molécules d'ARNm naissantes fortement traduites (Proshkin et al. 2010). Les nombreux ribosomes peuvent bloquer le recul de la RNAP et empêcher la réparation de l'ADN. En diminuant la quantité de ribosomes, le (p)ppGpp favorise également le recul de la RNAP sur les gènes fortement exprimés. Cependant, une étude ultérieure n'a pas réussi à reproduire les résultats de (Kamarthapu et al. 2016) et met en doute le lien existant entre (p)ppGpp et TCR médié par UvrD (Adebali, Sancar, and Selby 2017). Cette dernière étude ne montre pas de différence dans le TCR entre une souche sauvage et une souche (p)ppGpp⁰. Les auteurs de cette étude suggèrent que Mfd est la seule voie de TCR

dans les cellules et que l'absence de (p)ppGpp n'affecte pas l'efficacité du TCR. Par conséquent, le rôle de l'hélicase UvrD (et de ses hélicases partenaires DinG et Rep) serait plutôt la résolution des conflits entre réplication et transcription (Boubakri et al. 2010). L'un des rôles proposés du (p)ppGpp est justement l'aide à la résolution de ces conflits (Figure 26) (Trautinger et al. 2005). Si la RNAP recule après avoir rencontré une lésion de l'ADN, elle devient difficile à débloquer par la fourche de réplication (Dutta et al. 2011). En déstabilisant les interactions RNAP-ADN, en diminuant l'initiation et la vitesse de transcription et en stoppant les fourches de réplication de l'ADN, le (p)ppGpp permettrait d'éviter les conflits entre réplication et transcription qui surviennent lorsque la RNAP a reculé face à une lésion de l'ADN. En induisant des pauses dans la transcription et la réplication, le (p)ppGpp permet également l'exposition de simples brins d'ADN (Kingston, Nierman, and Chamberlin 1981; Krohn and Wagner 1996). L'exposition de ces simples brins d'ADN induit indirectement l'expression des gènes de la réponse SOS (Durfee et al. 2008). Pour conclure, bien que l'absence de (p)ppGpp soit fortement corrélée à une plus grande sensibilité aux stress génotoxiques, le rôle de la réponse stringente dans la réparation de l'ADN est toujours incertain (Rasouly, Pani, and Nudler 2017).

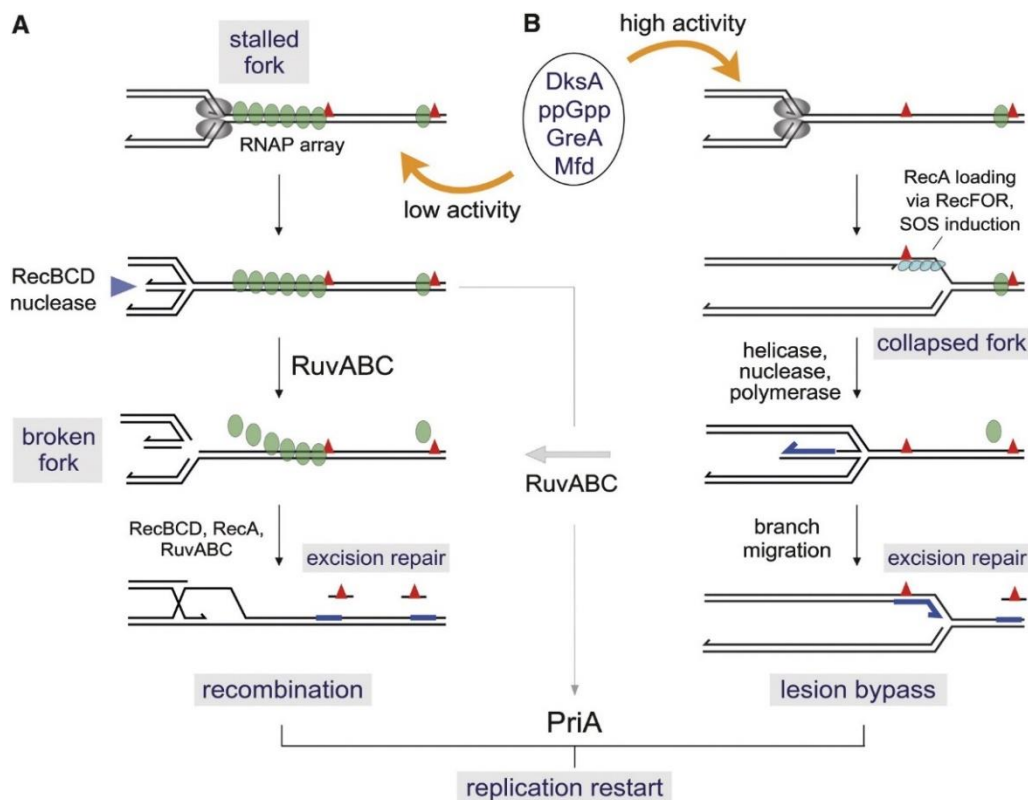


Figure 26. Modèle proposé de réparation de l'ADN et de résolution des conflits entre réplication et transcription par le (p)ppGpp.

(A) Les concentrations faibles de (p)ppGpp et les faibles activités de DksA, GreA et Mfd peuvent induire un arrêt de la réplication lorsque la fourche de réplication rencontre une région avec des RNAP bloquées par

une lésion à l'ADN. L'inversion de la fourche de réplication induit la formation d'une jonction Holliday. Le sauvetage ultérieur de la fourche se produit via la nucléase RecBCD ou par recombinaisons. La recombinaison est obligatoire si RuvABC casse la fourche. La réplication productive reprend à condition que le bloc initial ait été supprimé. **(B)** Les concentrations fortes de (p)ppGpp et les fortes activités de DksA, GreA et Mfd diminuent le blocage des RNAP aux lésions de l'ADN. Lorsqu'une fourche rencontre une lésion de l'ADN, un ADN simple brin est exposé sur lequel RecA est chargée et induit l'expression des protéines de la réponse SOS (RecQ, UvrA, UvrB, UvrD, UmuCD et DinB). L'inversion de la fourche peut se produire via des activités d'hélicase (RecQ, UvrD) et d'exonucléase spécifique de brin (RecJ) ou par migration de branche d'ADN (RecG), offrant de nombreuses façons de sauver la fourche sans recombinaisons. Si RuvABC sont présentes et cassent la fourche, la réplication reprend ensuite via la recombinaison. Dans tous les cas (A ou B), la réplication redémarre grâce à la protéine PriA. Figure provenant de la référence (Trautinger et al. 2005).

Quelques exemples du rôle du (p)ppGpp dans la pathogénicité. En régulant l'expression de nombreux facteurs de virulence, le (p)ppGpp participe à la pathogénicité de nombreuses espèces bactériennes [voir (Dalebroux et al. 2010) pour une revue sur la virulence et le (p)ppGpp]. Le (p)ppGpp participe à plusieurs stades de l'infection et les souches (p)ppGpp⁰ sont moins virulentes que les souches sauvages. Chez *E. coli*, la réponse stringente diminue la synthèse des flagelles et augmente la synthèse des fimbriae, favorisant ainsi les interactions et l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales (Åberg, Shingler, and Balsalobre 2006; Lemke, Durfee, and Gourse 2009). Chez *Enterococcus faecium*, en levant la répression de CodY le (p)ppGpp stimule la formation de biofilm sur des cathéters urinaires dans un modèle murin (Colomer-Winter et al. 2019). Chez *Enterococcus faecalis*, l'absence de (p)ppGpp diminue la tolérance à la vancomycine et la virulence dans un modèle de poisson-zèbre (Abranches et al. 2009). Chez *Streptococcus pneumoniae*, le (p)ppGpp permet l'expression de la toxine Ply (Kazmierczak et al. 2009). Cette toxine cytotoxique et proinflammatoire participe à l'invasion du sang par les bactéries en passant par les tissus pulmonaires (Cockeran, Anderson, and Feldman 2002). Lors des infections chroniques à *Mycobacterium tuberculosis*, la bactérie est naturellement résistante à l'antituberculeux isoniazide et cette tolérance dépend directement de la production de (p)ppGpp (Dutta et al. 2019). Enfin, la production de (p)ppGpp peut également conférer à *E. coli* la résistance au mecillinam, mais le mécanisme mis en place par la réponse stringente pour conférer cette résistance est toujours inconnu (Thulin, Sundqvist, and Andersson 2015). Un inhibiteur de la synthèse du (p)ppGpp, la relacin, est une molécule intéressante mais active uniquement sur les bactéries monodermes (Wexselblatt et al. 2012). Les auteurs de cette étude ont notamment montré que la relacin était capable d'inhiber la formation de biofilms et de spores chez *Bacillus subtilis* et *Bacillus anthracis*. En améliorant la pénétration et l'efficacité d'inhibition de la relacin, des analogues pourraient servir d'adjuvants et améliorer les traitements actuels en diminuant la virulence et la tolérance aux antibiotiques de certains pathogènes (Wexselblatt et al. 2013).

Objectifs

Le peptidoglycane est majoritairement réticulé par les D,D-transpeptidases de la famille des PBP chez la plupart des bactéries, et majoritairement par les L,D-transpeptidases chez quelques bactéries pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis* ou *Clostridium difficile*. Chez *E. coli*, la contribution des LDT est importante uniquement en phase stationnaire de croissance ou en biofilm, mais l'absence des LDT n'a presque pas d'impact phénotypique sur la croissance en conditions de laboratoire. Cette absence de phénotype rend difficile l'étude des LDT de *E. coli*, qui est pourtant l'un des modèles bactériens les plus étudiés et comprenant le plus d'outils génétiques à notre disposition. La résistance aux β -lactamines médiée par les L,D-transpeptidases, identifiée pour la première fois chez *E. faecium* en 2000 puis chez *E. coli* en 2016, offre un phénotype facilement exploitable pour étudier le fonctionnement de la LDT YcbB de *E. coli*. En s'appuyant sur ce phénotype de résistance aux β -lactamines médiée par YcbB, trois objectifs ont été poursuivis.

(i) Tous les modèles de synthèse de peptidoglycane prédisent que l'insertion de nouveau matériel nécessite une hydrolyse ménagée par des endopeptidases qui génèrent l'espace nécessaire à l'insertion de nouvelles chaînes glycanes et à l'expansion du peptidoglycane. Le premier objectif de la thèse est de déterminer quelles endopeptidases sont nécessaires à la synthèse du peptidoglycane lorsque YcbB est la seule transpeptidase fonctionnelle et d'identifier leurs spécificités pour les ponts de type 4 \rightarrow 3 ou 3 \rightarrow 3.

(ii) Dans la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB, les cibles des β -lactamines (PBP) sont toujours présentes dans le périplasme et sont inactivées en présence de β -lactamines bien que leur activité D,D-transpeptidase ne participe pas à la formation des ponts interpeptidiques. Ceci est potentiellement associé à des effets en aval qui peuvent être létaux. Le deuxième objectif de la thèse est d'identifier à l'échelle du génome l'ensemble des gènes nécessaires à la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB en permettant (i) de contrecarrer les effets létaux associés à la fixation des β -lactamines à leurs cibles et (ii) de maintenir un peptidoglycane osmoprotectant durant la totalité du cycle cellulaire.

(iii) La résistance aux β -lactamines médiée par YcbB chez *E. coli* nécessite la production de l'alarmone (p)ppGpp aux effets pléiotropiques. Le dernier objectif de la thèse est d'identifier les cibles de cette alarmone spécifiquement impliquées dans la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB et de déterminer si la modulation de l'activité de ces cibles est directe (activation ou inhibition d'une activité enzymatique) ou indirecte (activation ou répression de la transcription).

Résultats

1. Les endopeptidases partenaires de YcbB



Introduction

La résistance aux β -lactamines médiée par la L,D-transpeptidase YcbB implique un remodelage complet du peptidoglycane, qui devient quasi-exclusivement réticulé par des ponts 3→3 (Hugonnet et al. 2016). La capacité de *E. coli* à pouvoir utiliser des transpeptidases de spécificité D,D ou L,D implique qu'il existe deux ensembles d'enzymes, potentiellement chevauchants, capable d'assurer les autres étapes de synthèse et de dégradation du peptidoglycane. Les enzymes nécessaires à la synthèse « classique » d'un peptidoglycane relié par des ponts 4→3 sont pour la plupart déjà connues et caractérisées, mais ce n'est pas le cas pour un peptidoglycane « alternatif » relié par des ponts 3→3. Au démarrage de ma thèse, nous savions que l'activité glycosyltransférase de la PBP1b et l'activité D,D-carboxypeptidase de la PBP5 étaient essentielles au mécanisme de résistance aux β -lactamines médiée par YcbB, mais l'essentialité des gènes impliqués dans d'autres fonctions de synthèse du peptidoglycane n'avait pas été explorée.

Le premier article se concentre sur la contribution des endopeptidases à la synthèse du peptidoglycane. Nous avons utilisé une approche gène candidat pour étudier spécifiquement l'essentialité de chaque endopeptidase pour la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB. Des délétions multiples et des complémentations fonctionnelles ont été réalisées pour définir les sous-ensembles minimaux d'endopeptidases nécessaires au métabolisme de peptidoglycane dans le contexte de la synthèse quasi-exclusive de ponts 4→3 ou 3→3. La purification des endopeptidases et leur caractérisation nous a également permis de redéfinir leurs spécificités de substrat en identifiant les produits d'hydrolyse de dimères issus du peptidoglycane de *E. coli*.

Article 1

Role of endopeptidases in peptidoglycan synthesis mediated by alternative cross-linking enzymes in *Escherichia coli*

Henri Voedts¹, Delphine Dorchêne¹, Adam Lodge^{2,‡}, Waldemar Vollmer² , Michel Arthur^{1,*}, † & Jean-Emmanuel Hugonnet^{1,**} 

Abstract

Bacteria resist to the turgor pressure of the cytoplasm through a net-like macromolecule, the peptidoglycan, made of glycan strands connected via peptides cross-linked by penicillin-binding proteins (PBPs). We recently reported the emergence of β -lactam resistance resulting from a bypass of PBPs by the YcbB L,D-transpeptidase (LdtD), which form chemically distinct 3→3 cross-links compared to 4→3 formed by PBPs. Here we show that peptidoglycan expansion requires controlled hydrolysis of cross-links and identify among eight endopeptidase paralogues the minimum enzyme complements essential for bacterial growth with 4→3 (MepM) and 3→3 (MepM and MepK) cross-links. Purified Mep endopeptidases unexpectedly displayed a 4→3 and 3→3 dual specificity implying recognition of a common motif in the two cross-link types. Uncoupling of the polymerization of glycan chains from the 4→3 cross-linking reaction was found to facilitate the bypass of PBPs by YcbB. These results illustrate the plasticity of the peptidoglycan polymerization machinery in response to the selective pressure of β -lactams.

Keywords endopeptidase; *Escherichia coli*; L,D-transpeptidase; peptidoglycan; β -lactam

Subject Categories Membranes & Trafficking; Microbiology, Virology & Host Pathogen Interaction

DOI 10.15252/embj.2021108126 | Received 26 February 2021 | Revised 22 July 2021 | Accepted 24 July 2021 | Published online 12 August 2021

The EMBO Journal (2021) 40: e108126

Introduction

Peptidoglycan (PG) is an essential macromolecule that surrounds the bacterial cell providing resistance to the osmotic pressure of the cytoplasm and determining cell shape (Turner *et al.*, 2014). PG is

assembled from a disaccharide peptide subunit consisting of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), *N*-acetylmuramic acid (MurNAc), and a stem pentapeptide linked to MurNAc (L-Ala¹- γ -D-Glu²-DAP³-D-Ala⁴-D-Ala⁵ in which DAP is diaminopimelic acid) (Fig 1A). The subunit is assembled by glycosyltransferases that polymerize glycan strands and transpeptidases that form amide bonds between stem peptides linked to adjacent glycan strands. *Escherichia coli* relies on two types of transpeptidases for the latter reaction (Magnet *et al.*, 2008). The D,D-transpeptidases, also referred to as penicillin-binding proteins (PBPs), form the most abundant cross-links, which connect the fourth residue (D-Ala⁴) of an acyl donor to the third residue (DAP³) of an acyl acceptor (4→3 cross-link) (Fig 1A). The L,D-transpeptidases (LDTs) form 3→3 cross-links that connect two DAP residues (Fig 1B). The D-Ala at the 5th and 4th positions of stem peptides that do not participate in cross-link formation as donors are fully and partially trimmed by carboxypeptidases of the D,D and L,D specificities, respectively (Fig 1C). PBPs and LDTs are structurally unrelated, rely on different catalytic nucleophiles (Ser versus Cys, respectively), and use different acyl donor stems (pentapeptide versus tetrapeptide, respectively) (Mainardi *et al.*, 2008; Sauvage *et al.*, 2008). PBPs and LDTs also differ by their inhibition profiles since PBPs are potentially inhibited by all classes of β -lactams (including penams, cepheems, monobactams, and carbapenems), whereas LDTs are effectively inhibited only by carbapenems (Mainardi *et al.*, 2005). LDTs are fully dispensable for growth of *E. coli*, at least in laboratory conditions, and form a minority of the cross-links during exponential growth (6% of the total cross-links) (Glauner *et al.*, 1988; Sanders & Pavelka, 2013). The proportion of 3→3 cross-links is higher in the stationary phase (Pisabarro *et al.*, 1985) and in cells experiencing outer membrane assembly stress (Morè *et al.*, 2019). By-pass of PBPs by LDTs leads to high-level resistance to β -lactams of the penam (such as ampicillin), cephem (ceftriaxone), and monobactam (aztreonam) classes in engineered *E. coli* strains that overproduce the YcbB L,D-transpeptidase, also referred to as LdtD, and the guanosine penta- and tetra-phosphate [(p)ppGpp]

¹ Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, Inserm, Université de Paris, Paris, France

² Centre for Bacterial Cell Biology, Biosciences Institute, Newcastle University, Newcastle Upon Tyne, UK

*Corresponding author. Tel: +33 671562988; E-mail: michel.arthur@crc.jussieu.fr

**Corresponding author. Tel: +33 668016084; E-mail: jean-emmanuel.hugonnet@crc.jussieu.fr

†These authors contributed equally to this work

‡Present address: Iksuda Therapeutics, The Biosphere, Newcastle upon Tyne, UK

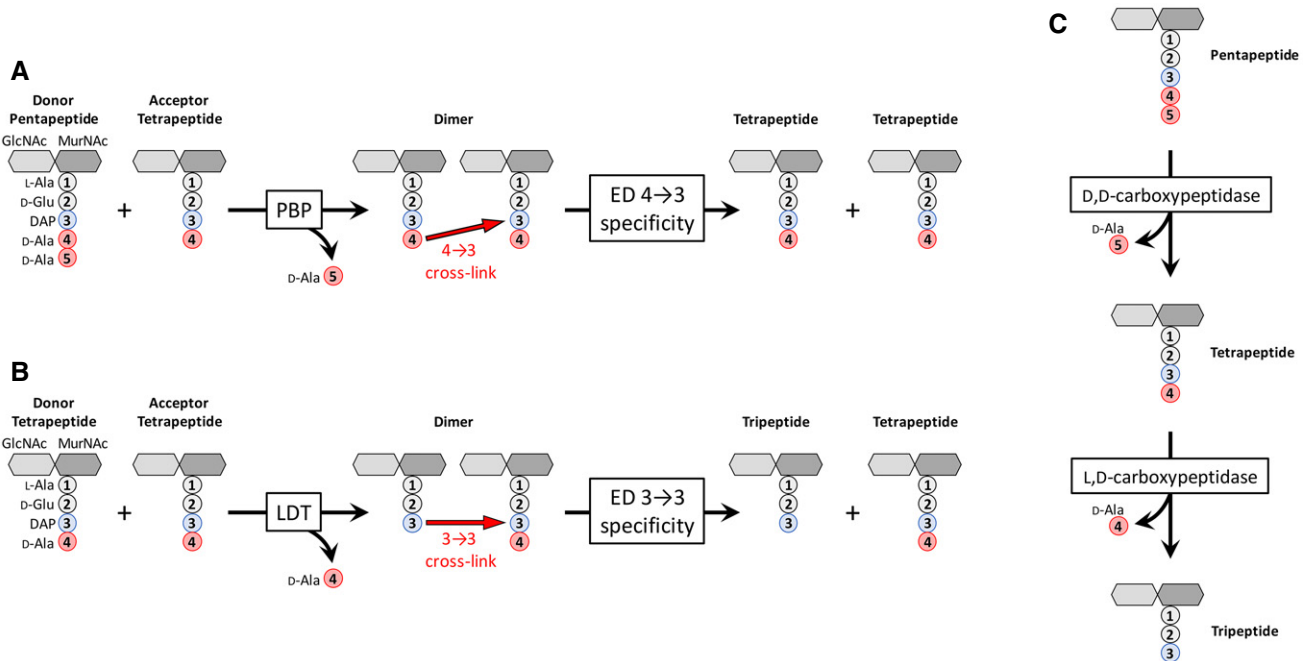


Figure 1. Metabolism of PG cross-links and maturation of free stem peptides.

A, B Formation and hydrolysis of (A) 4→3 and (B) 3→3 cross-links. The disaccharide pentapeptide unit is assembled from *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), *N*-acetylmuramic acid (MurNAc), and five amino acids including *meso*-diaminopimelic acid (DAP), which is linked via its L (S) center to the γ -carboxyl group of D-Glu. C Hydrolysis of the D-Ala⁴-D-Ala⁵ and DAP³-D-Ala⁴ peptide bonds by carboxypeptidases of D,D and L,D specificities, respectively.

alarmones (Hugonnet *et al*, 2016). PG of such strains grown in the presence of β -lactams exclusively contains 3→3 cross-links, indicating that the D,D-transpeptidase activity of PBP is fully replaced by the L,D-transpeptidase activity of LDTs.

Expansion of PG is thought to require highly regulated hydrolytic activities that spatially control the insertion of new subunits into the growing network of cross-linked glycan strands (Singh *et al*, 2012; Vollmer, 2012). Due to the covalent net-like structure of PG, endopeptidases are predicted to be required for insertion of new subunits leading to the expansion of the PG layer (Fig EV1) (De Jonge *et al*, 1989; Höltje & Heidrich, 2001). The *E. coli* genome encodes eight endopeptidase paralogues that belong to five enzyme families (Singh *et al*, 2012; Chodiseti & Reddy, 2019; Pazos & Peters, 2019). PBP4, PBP7, and AmpH belong to the acyl-serine transferase superfamily, which also comprises D,D-transpeptidases and D,D-carboxypeptidases. Members of this superfamily are inhibited by β -lactam antibiotics. The NlpC/P60 cysteine peptidase family comprises two paralogues (MepH and MepS). Metallo-enzymes are represented by three enzyme families, LAS metallopeptidases, lysostaphin/M23 peptidases, and M15 peptidases, each contributing one paralogue (MepA, MepM, and MepK, respectively). The specificity of these eight paralogues as endopeptidases or carboxypeptidases (Fig 1) has been explored by using sacculi or purified PG fragments as substrates (Keck & Schwarz, 1979; Korat *et al*, 1991; Engel *et al*, 1992; Romeis & Holtje, 1994; Gonzalez-Leiza *et al*, 2011; Singh *et al*, 2012; Chodiseti & Reddy, 2019). PBP4, PBP7, AmpH, MepH, and MepS hydrolyze 4→3 cross-links but PG dimers containing 3→3 cross-links were not tested. In contrast, MepA, MepM, and MepK were fully characterized revealing that MepA hydrolyzes both 4→3

and 3→3 cross-links, MepM is specific to 4→3 cross-links, and MepK displays a marked preference for 3→3 cross-links. The endopeptidases of *E. coli* are redundant, and their essential roles can only be revealed by introducing multiple chromosomal deletions. One study unambiguously showed that hydrolysis of 4→3 cross-links by endopeptidases is essential as the triple deletion of genes encoding MepH, MepM, and MepS was not compatible with growth of *E. coli* in laboratory conditions (Singh *et al*, 2012; comment by Vollmer, 2012). Several endopeptidases interact genetically and physically with the outer membrane-anchored adaptor protein NlpI supporting overlapping functions during the cell cycle (Banzhaf *et al*, 2020). Various roles have been assigned to endopeptidases in bacteria other than *E. coli* such as the determination of cell shape in *Helicobacter pylori* (Bonis *et al*, 2010), release of NOD agonist in *Neisseria gonorrhoeae* (Lenz *et al*, 2017), or persistence in *Mycobacterium tuberculosis* (Healy *et al*, 2020).

The dual capacity of *E. coli* to use transpeptidases of the D,D and L,D specificities raises the possibility that polymerization of PG containing 4→3 or 3→3 cross-links involves two overlapping sets of endopeptidases. To address this question, we used an *E. coli* strain that conditionally and exclusively relies on the formation of 3→3 cross-links for growth in the presence of ampicillin or ceftriaxone (Hugonnet *et al*, 2016). By introducing serial deletions of endopeptidase genes, we showed that the 4→3 and 3→3 modes of PG polymerization both require hydrolysis of cross-links. We identified distinct sets of endopeptidases that are essential for growth involving the two modes of PG cross-linking. Strikingly, impaired digestion of nascent glycan strands by a lytic transglycosylase was found to favor PG cross-linking mediated by LDTs. These results highlight

the functional plasticity of PG polymerization complexes to accommodate various PG cross-linking enzymes and hydrolases.

Results

MepM is essential for β -lactam resistance mediated by the YcbB L,D-transpeptidase

The role of endopeptidases was assessed in *E. coli* BW25113 $\Delta relA$ pKT2(*ycbB*) pKT8(*relA'*), BW25113(*ycbB*, *relA'*) in short, which enables controlling the relative contribution of formation of 4 \rightarrow 3 and 3 \rightarrow 3 cross-links to PG polymerization (Hugonnet *et al.*, 2016). In this strain, the *ycbB* L,D-transpeptidase gene carried by plasmid pKT2 is expressed under the control of an IPTG-inducible promoter. Plasmid pKT8 carries an L-arabinose-inducible copy of the *relA'* gene encoding a truncated version of RelA (residues 1–455), which synthesizes the (p)ppGpp alarmone in an unregulated manner due to the absence of the C-terminal ribosome binding module (Schreiber *et al.*, 1991). In the presence of both inducers, production of YcbB and RelA' is sufficient for full bypass of the D,D-transpeptidase activity of PBPs by the L,D-transpeptidase activity of YcbB (Fig 2A). This enables bacterial growth in the presence of ampicillin or ceftriaxone since these drugs do not inhibit the YcbB L,D-transpeptidase. Testing for the inducible expression of β -lactam resistance in BW25113(*ycbB*, *relA'*) therefore provides a means to identify genes that are essential for growth when PG cross-linking is exclusively mediated by the YcbB L,D-transpeptidase. We used this phenotypic assay to assess the individual role of seven of the eight endopeptidases of *E. coli* following single-gene deletions in the BW25113(*ycbB*, *relA'*) strain (Fig 2B). The remaining endopeptidase MepK could not be tested by this approach since deletion of the corresponding gene was not compatible with the presence of plasmid pKT2(*ycbB*) (see below). Mutants with deletion of *mepA*, *mepH*, *dacB*, *pbpG*, or *ampH* were resistant to ceftriaxone. Deletion of *mepS* decreased plating efficiency in the presence of the drug. Deletion of *mepM* abolished the expression of β -lactam resistance. These results are surprising since MepM and MepS were not reported to hydrolyze 3 \rightarrow 3 cross-links (Singh *et al.*, 2012; Chodiseti & Reddy, 2019).

Production of YcbB is lethal in the absence of MepK

The gene encoding MepK, an endopeptidase with the dual 4 \rightarrow 3 and 3 \rightarrow 3 specificities, was readily deleted from the chromosome of BW25113 $\Delta relA$. The resulting strain, BW25113 $\Delta relA$ $\Delta mepK$, was transformed with pKT2(*ycbB*), pKT8(*relA'*), or both plasmids in combination (co-transformation). Tetracycline and chloramphenicol were used to select transformants that acquired pKT2(*ycbB*) and pKT8(*relA'*), respectively. Plasmid pKT8(*relA'*) was readily introduced into BW25113 $\Delta relA$ $\Delta mepK$ by transformation (10^8 transformants per μ g of DNA). Plasmid pKT2(*ycbB*) alone or in combination with pKT8(*relA'*) could not be introduced into BW25113 $\Delta relA$ $\Delta mepK$ (< 5 transformants per μ g of DNA). The same plating efficacies were observed in selective media containing IPTG, L-arabinose, or both inducers, in addition to tetracycline and chloramphenicol. These results show that production of the YcbB L,D-transpeptidase is lethal in the absence of MepK, in agreement with a recent report

(Chodiseti & Reddy, 2019). Thus, cleavage of 3 \rightarrow 3 cross-links by MepK is essential for bacterial growth when the proportion of 3 \rightarrow 3 cross-links is increased in the presence of a plasmid copy of *ycbB*. Quantitatively, the basal level of *ycbB* expression in the absence of IPTG was sufficient for the lethal phenotype associated with the *mepK* deletion. Under non-inducing conditions, the relative proportion of 4 \rightarrow 3 and 3 \rightarrow 3 cross-links in the PG extracted from exponential phase cultures of BW25113(*ycbB*, *relA'*) was in the order of 60 and 40%, respectively (data not shown). Thus, the cleavage of 3 \rightarrow 3 cross-links by MepK was essential even if these cross-links co-existed with 4 \rightarrow 3 cross-links formed by the PBPs.

The hydrolytic activity of MepM is essential for β -lactam resistance

Deletion of the *mepM* gene abolished YcbB-mediated β -lactam resistance (above, Fig 2B) even though this endopeptidase was not reported to cleave 3 \rightarrow 3 cross-links (Singh *et al.*, 2012; Chodiseti & Reddy, 2019). We therefore considered the possibility that the essential role of *mepM* in resistance could involve an as yet unknown function in addition to its 4 \rightarrow 3-endopeptidase activity. MepM (440 residues) comprises a LytM (lysostaphin/M23 peptidase) domain and a LysM PG-binding domain (Pfam: P0AFS9). Complementation analysis of the *mepM* deletion in BW25113(*ycbB*, *relA'*) was performed with plasmids encoding (i) MepM, (ii) MepM H³⁹³A harboring an Ala residue at position 393 in place of an essential catalytic His residue conserved in members of the M23 peptidase family, and (iii) MepM Δ LytM lacking the C-terminal endopeptidase catalytic domain (Fig 3). Expression of β -lactam resistance by BW25113(*ycbB*, *relA'*) $\Delta mepM$ was only restored by the plasmid harboring an intact copy of the *mepM* gene. Thus, the complementation analysis led to the conclusion that the endopeptidase activity of MepM is essential for YcbB-mediated resistance to β -lactams.

The essential role of the endopeptidase activity of MepM in β -lactam resistance is not restricted to the transition from 4 \rightarrow 3 to 3 \rightarrow 3 cross-links triggered by the induction of *ycbB* and *relA'*

The experiment reported above did not rule out the possibility that hydrolysis of 4 \rightarrow 3 cross-links by MepM might be transiently essential to enable bypass of PBPs by YcbB, *i.e.*, cleavage of 4 \rightarrow 3 cross-links by MepM could be initially essential to enable insertion of new PG subunits into the PG network by YcbB. Ultimately, this would lead to replacement of 4 \rightarrow 3 by 3 \rightarrow 3 cross-links and could then suppress the essential role of 4 \rightarrow 3 cross-link cleavage by MepM. According to this hypothesis, MepM would only be essential during the transition between the two modes of PG cross-linking. To test this possibility, we sought a plasmid construct enabling tight regulation of the *mepM* gene. In a first attempt, *mepM* was cloned under the control of the L-rhamnose-inducible promoter (P_{rhaBAD}) of the pHV30 vector. Complementation of the *mepM* deletion of BW25113(*ycbB*, *relA'*) was obtained both in the presence or absence of L-rhamnose indicating that the un-induced level of *ycbB* afforded by this plasmid construct was too high (Fig 4A). To address this issue, the level of *mepM* expression was reduced by replacing the sequence containing the translation initiation signal (TIS1) of *mepM* by a weaker translation initiation signal (TIS2). TIS1 (aAAGAGGA

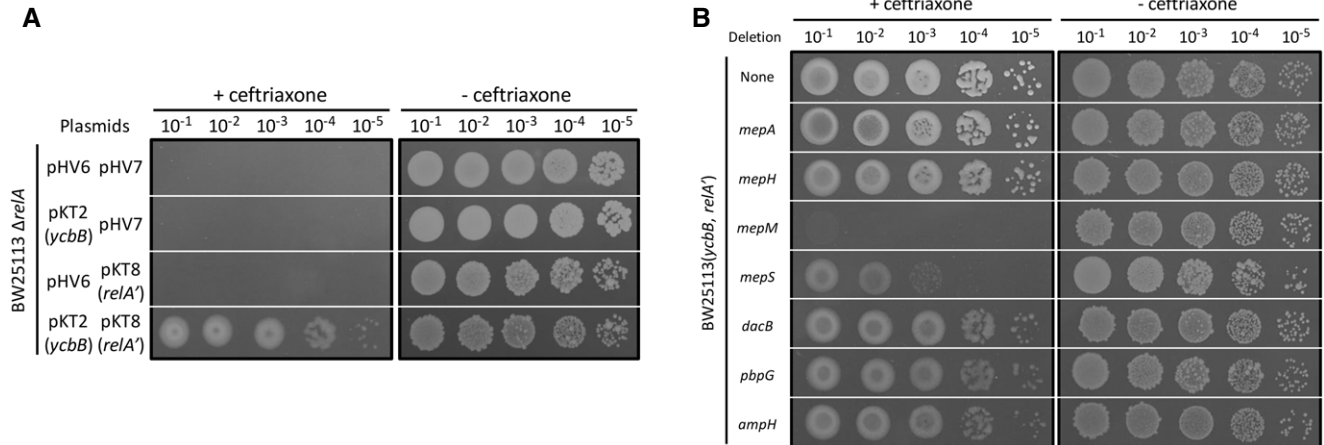


Figure 2. MepM is essential for YcbB-mediated β-lactam resistance.

Growth was tested in the presence of ceftriaxone at 8 μg/ml (+ ceftriaxone) or in the absence of the drug (– ceftriaxone) on BHI agar plates supplemented with 40 μM IPTG and 1% L-arabinose for induction of *ycbB* and *relA'*, respectively.

A BW25113 $\Delta relA$ derivatives harboring plasmids pKT2(*ycbB*), pKT8(*relA'*) and the vectors pHV6 and pHV7 used to construct these plasmids, respectively. Expression of β-lactam resistance requires induction of both *ycbB* and *relA'*.

B BW25113(*ycbB*, *relA'*) and its derivatives obtained by individual deletion of endopeptidase genes. BW25113(*ycbB*, *relA'*) is an abbreviated name for BW25113 $\Delta relA$ pKT2(*ycbB*) pKT8(*relA'*).

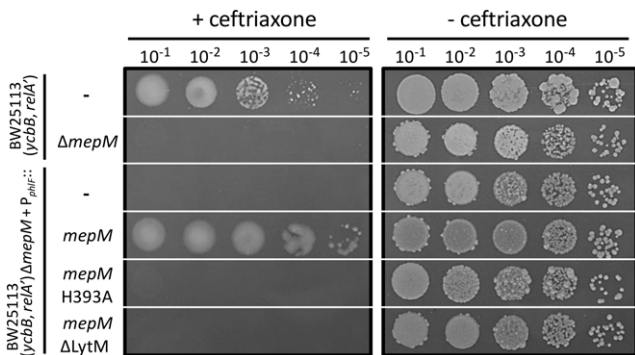


Figure 3. MepM endopeptidase activity is required for YcbB-mediated β-lactam resistance.

Growth of BW25113(*ycbB*, *relA'*), BW25113(*ycbB*, *relA'*) $\Delta mepM$, and its derivatives harboring plasmids encoding MepM, MepM H³⁹³A, and MepM Δ LytM were tested in the presence of ceftriaxone at 8 μg/ml (+ ceftriaxone) or in the absence of the drug (– ceftriaxone) in BHI agar plates supplemented with 40 μM IPTG and 1% L-arabinose for induction of *ycbB* and *relA'*, respectively. The genes encoding MepM, MepM H³⁹³A, and MepM Δ LytM were inserted into the vector pHV9 under the control of the P_{phIF} promoter, which is inducible by 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG). Basal level of expression of *mepM* under the control of P_{phIF} was sufficient to restore ceftriaxone resistance in the absence of the inducer.

GAAAtgacataATG) combined an ATG initiation codon to a “strong” ribosome binding site (RBS) with extensive complementarity (underlined) to the 3' OH extremity of 16S rRNA (5'- AUCACCUC CUUA-3'OH) (Elowitz & Leibler, 2000). TIS2 (acacAGGAcacttaTTG) combined a TTG initiation codon to an RBS with limited complementarity to 16S rRNA (5'- AUCACCUCUUA-3'OH) (Ringquist et al., 1992; Vellanoweth & Rabinowitz, 1992; Hecht et al., 2017). In contrast to the results obtained with TIS1, the presence of L-rhamnose was required for β-lactam resistance if *mepM* was

expressed under the control of TIS2 (Fig 4A). L-rhamnose requirement for growth in the presence of ceftriaxone was not abolished by pre-exposure to the inducer (Fig 4B). These results indicate that the essential role of MepM in β-lactam resistance is not limited to the transition between the two modes of PG cross-linking, i.e., from 4→3 to 3→3. Since all D,D-transpeptidases are inhibited by ceftriaxone, these results also indicate that the hydrolytic activity of MepM is essential in conditions in which 4→3 cross-links are not detectable (Kocaoglu & Carlson, 2015; Hugonnet et al., 2016).

MepM hydrolyzes both 4→3 and 3→3 cross-links in vitro

The essential role of the endopeptidase activity of MepM in the context of LDT-mediated PG cross-linking (above) led us to reconsider the specificity of the enzyme. Previous analyses were based on incubation of MepM and lysozyme with an *E. coli* PG preparation containing minute amounts of 3→3 cross-links (Singh et al., 2012; Chodisetti & Reddy, 2019). Analyses of rPHPLC profiles revealed that the major dimers containing 4→3 cross-links were digested by MepM but minor peaks corresponding to dimers containing 3→3 cross-links remained unchanged in the presence of the enzyme leading to the conclusion that MepM was specific to 4→3 cross-links (Singh et al., 2012; Chodisetti & Reddy, 2019). To improve the sensitivity of the assay, we purified MepM and reproduced this analysis with a PG preparation of *E. coli* BW25113 grown to stationary phase in minimal medium, which contained a higher proportion of 3→3 cross-links (Fig 5A, upper panel). The muropeptides corresponding to the indicated peaks are shown in Fig 5B (see Fig EV2 for determination of the structure of muropeptides by mass spectrometry). Full digestion of all dimers was observed upon incubation of this PG preparation with MepM (5 μM) indicating that the endopeptidase hydrolyzes both 4→3 and 3→3 cross-links to completion (Fig 5A, lower panel).

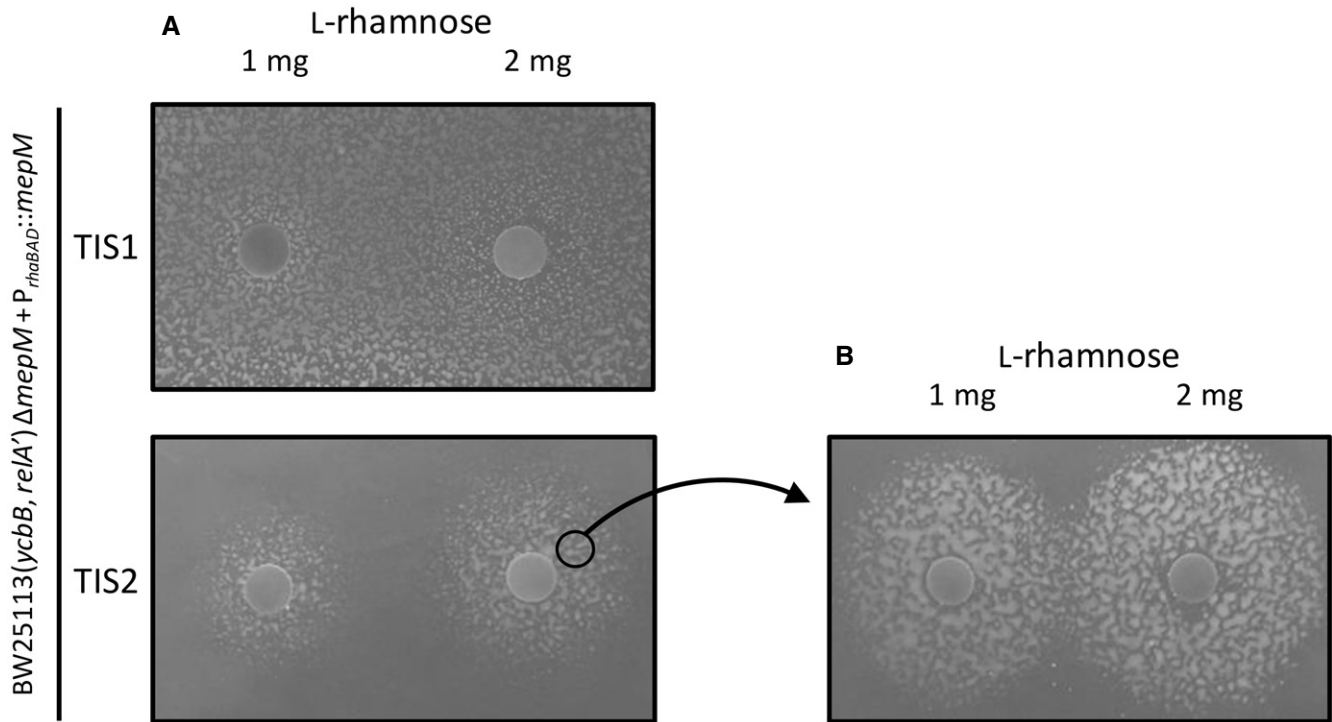


Figure 4. MepM is essential for β -lactam resistance beyond the transition from 4 \rightarrow 3 to 3 \rightarrow 3 PG cross-linking.

The *mepM* gene was expressed under the control of TIS1 or TIS2 (translation initiation) and of P_{rhaBAD} (the L-rhamnose-inducible promoter of vector pHV30). Growth of BW25113(*ycbB*, *relA'*) Δ *mepM* harboring the pHV30 derivatives was tested on BHI agar supplemented with 8 μ g/ml ceftriaxone, 40 μ M IPTG (induction of *ycbB*) and 1% L-arabinose (induction of *relA'*).

- A For TIS2, growth around paper disks containing 1 or 2 mg of L-rhamnose indicated that induction of the expression of *mepM* was required for ceftriaxone resistance. In contrast, a higher level of translation from TIS1 was sufficient for ceftriaxone resistance in the absence of the inducer.
- B The experiment was repeated with bacteria pre-exposed to L-rhamnose that were harvested at the vicinity of the disk containing 2 mg of L-rhamnose. Expression of ceftriaxone resistance remained dependent on the presence of L-rhamnose indicating that the requirement for MepM is not transient. The diameter of the growth zones is larger in panel (B) than in panel (A) as expected from the fact that bacteria in the inoculum used in (B) had been grown in the presence of the inducer and already contained MepM. In (A) growth is only possible after diffusion of L-rhamnose in the medium prior to the action of ceftriaxone. At a distance from the disk, diffusion was not sufficiently rapid to observe resistance.

Incubation of the PG preparation with lower concentrations of MepM led to partial hydrolysis of the dimers (Fig 5C). Comparison of the relative abundance of mucopeptides based on the integration of peak areas in the chromatograms showed the expected increase in monomers upon digestion of dimers (Fig 5D). The concentrations of MepM required for hydrolysis of half of the mucopeptides containing 4 \rightarrow 3 and 3 \rightarrow 3 cross-links were 0.4 and 0.7 μ M, respectively, revealing similar apparent hydrolysis efficacies for the two types of cross-links under the assay conditions (Fig 5D). These results indicate that hydrolysis of 3 \rightarrow 3 cross-links may account for the essential role of MepM in conditions in which the L,D-transpeptidase activity of YcbB fully replaces the D,D-transpeptidase activity of the PBPs, as inferred from expression of ceftriaxone resistance by BW25113(*ycbB*, *relA'*) but not by its Δ *mepM* derivative (Fig 2B).

The sum of the relative proportion of tripeptide and tetrapeptide stems in all monomers and dimers did not vary upon addition of MepM (Fig 5E). This observation indicates that MepM did not hydrolyze D-Ala⁴ from tetrapeptide monomers or from tetrapeptide stems located in the acceptor position of dimers. Thus, MepM did not display any L,D-carboxypeptidase activity.

Design of an assay to investigate the redundancy of endopeptidases required for YcbB-mediated β -lactam resistance

Single deletion of endopeptidase genes revealed four phenotypes (above, Fig 2B). (i) Deletion of *mepK* was not compatible with production of YcbB. (ii) Deletion of *mepM* abolished YcbB-mediated ceftriaxone resistance. (iii) Deletion of *mepS* impaired growth in the presence of ceftriaxone. (iv) Deletion of *mepA*, *mepH*, *dacB*, *pbpG*, or *ampH* had no impact on growth in the presence of ceftriaxone. The absence of any phenotypic alteration associated with the individual deletion of the latter genes does not necessarily imply that the corresponding endopeptidases are unable to participate in the hydrolysis of 3 \rightarrow 3 cross-links. Indeed, the function of these enzymes may be redundant. Alternatively, their level of production may be insufficient under the tested growth conditions. To investigate these possibilities, each of the eight endopeptidase genes was independently cloned under the control of the “strong” TIS1 translation initiation signal downstream from the P_{rhaBAD} promoter of the vector pHV30 in order to modulate the level of endopeptidase production based on induction by L-rhamnose. The plasmids were introduced into BW25113(*ycbB*, *relA'*) Δ *mepM*, and growth of the

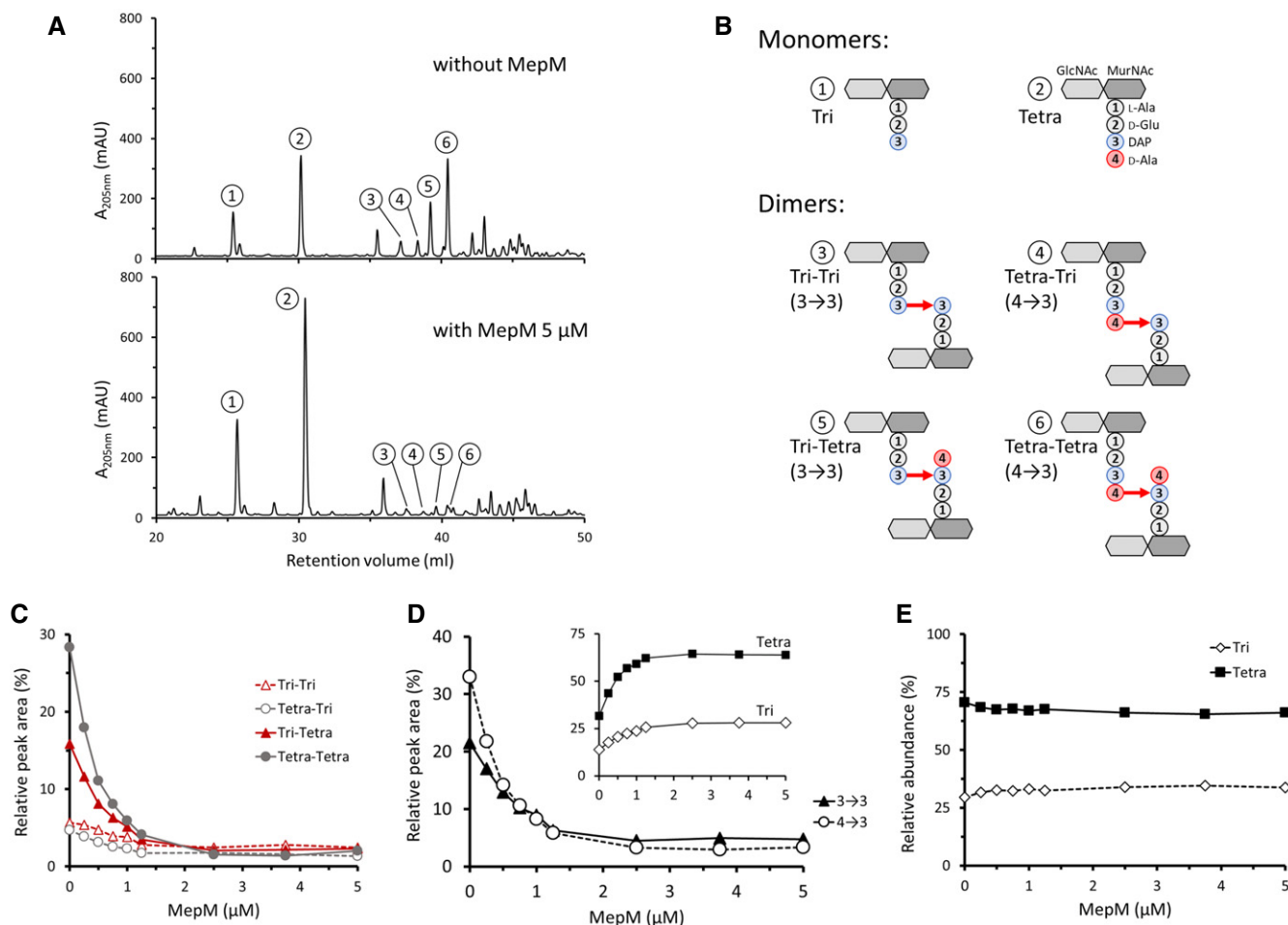


Figure 5. Hydrolysis of 4→3 and 3→3 cross-links by purified MepM.

- A *r*PHPLC chromatograms of sacculi isolated from BW25113 grown in minimal medium to stationary phase and digested by lysozyme (upper panel) or by lysozyme and 5 μM MepM (lower panel). Absorbance was monitored at 205 nm (mAU, milli-absorbance unit).
- B Structure of the muropeptides as determined by mass spectrometry (Fig EV2).
- C Hydrolysis of the four types of dimers by MepM. Sacculi were incubated with lysozyme and MepM at various concentrations. The relative abundance of the muropeptides was estimated by calculating the relative peak areas.
- D Hydrolysis of dimers containing 4→3 and 3→3 cross-links by MepM. The relative peak areas of Tri-Tri and Tri-Tetra containing 3→3 cross-links and that of Tetra-Tri and Tetra-Tetra containing 4→3 cross-links were combined. The inset shows variations in the relative peak areas of the Tri and Tetra monomers.
- E Relative abundance of Tri and Tetra stems in all muropeptides.

resulting strains was tested in the presence or absence of L-rhamnose and in the presence or absence of ceftriaxone in all combinations (Fig 6).

Overexpression of *mepM* is toxic in the presence of ceftriaxone

The assay described above revealed that the basal level of expression of the plasmid copy of *mepM* in the absence of the inducer was sufficient to restore growth of BW25113(*ycbB*, *relA'*) Δ *mepM* in the presence of ceftriaxone (Fig 6). Induction of the *mepM* gene by L-rhamnose prevented growth in the presence of ceftriaxone but not in the absence of the drug. Importantly, MepM toxicity was only observed when its production was under the control of the effective TIS1 translation initiation signal, but not of the weaker TIS2 signal

used for the experiment described in Fig 4. These results suggest that overproduction of MepM inhibits growth by cleavage of 3→3 cross-links if 4→3 cross-links are absent due to the inactivation of the PBPs by ceftriaxone.

Overexpression of *mepS* complements the *mepM* deletion for expression of YcbB-mediated β -lactam resistance

MepS restored growth of BW25113(*ycbB*, *relA'*) Δ *mepM* only in the presence of the inducer (Fig 6). Thus, MepM and MepS have overlapping functions although overproduction of MepS was required to compensate for the absence of MepM. As mentioned above (Fig 2B), deletion of *mepS* impaired but did not abolish ceftriaxone resistance in BW25113(*ycbB*, *relA'*). Together, these results indicate that

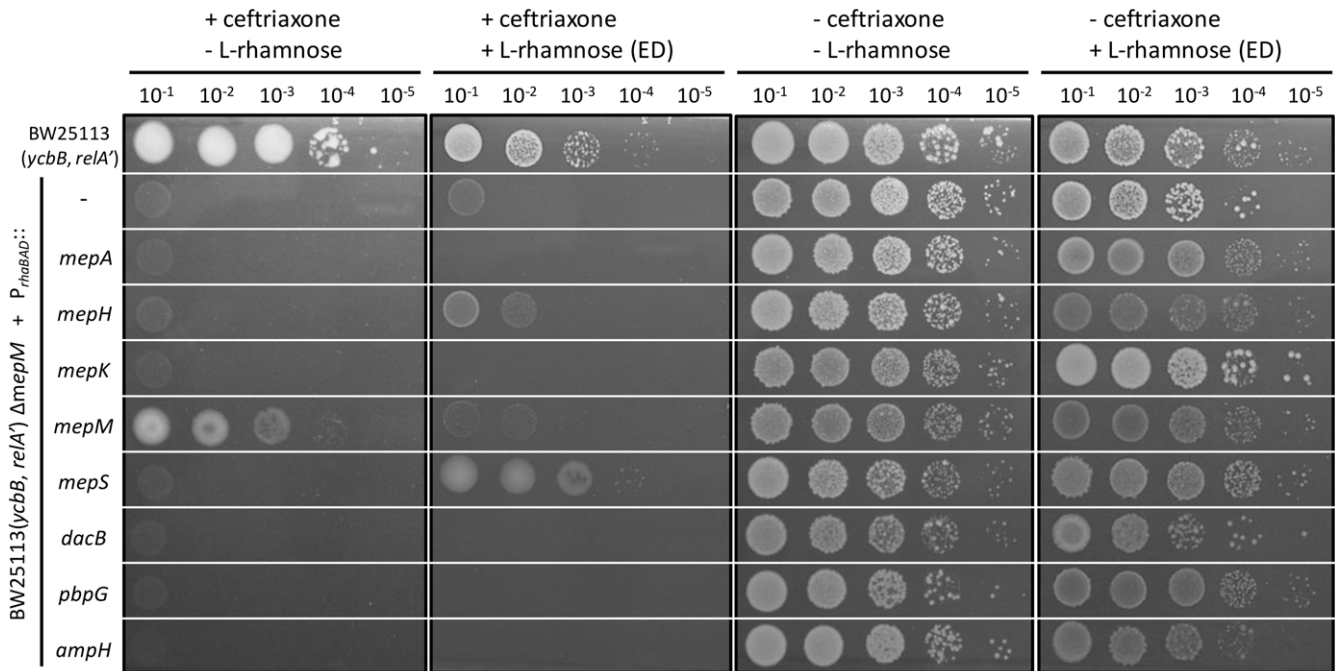


Figure 6. Complementation of the *mepM* deletion by plasmids encoding L-rhamnose-inducible copies of the eight endopeptidase genes.

Functional complementation of the *mepM* deletion in BW25113(*ycbB*, *relA'*) Δ *mepM* was performed with the pHV30 vector or recombinant plasmids encoding each of the eight endopeptidases under the control of the P_{rhoBAD} promoter and of the TIS1 translation initiation signal. Induction of endopeptidase (ED) genes was performed with 0.2% L-rhamnose in the presence or absence of 8 μ g/ml ceftriaxone. BHI agar plates contained 40 μ M IPTG and 1% L-arabinose for induction of *ycbB* and *relA'*, respectively.

expression of *mepS* in its native chromosomal environment contributes to resistance but the level of its expression is not sufficient to compensate for the absence of MepM.

Partial complementation of the *mepM* deletion by *mepH*

The plasmid encoding MepH partially restored growth of BW25113(*ycbB*, *relA'*) Δ *mepM* on ceftriaxone only in the presence of L-rhamnose (Fig 6). This result indicates that MepH, like MepS, replaces MepM for the expression of ceftriaxone resistance if MepH is overproduced.

Purified MepS and MepH hydrolyze 4→3 and 3→3 cross-links (endopeptidase activity) and the DAP-D-Ala bond of tetrapeptide stems (L,D-carboxypeptidase activity)

Complementation of Δ *mepM* by overproduction of MepS and MepH prompted us to evaluate the specificity of these enzymes, as described above for MepM. MepH and MepS both hydrolyzed 4→3 and 3→3 cross-links (Fig 7A and B). MepS showed no preference for 4→3 or 3→3 cross-links, while MepH displayed a strong preference for 4→3 cross-links. The weak hydrolytic activity of MepH on 3→3 cross-links may account for the fact that the overproduction of MepH can only partially compensate for the absence of MepM (Fig 6, above). Both MepS and MepH displayed L,D-carboxypeptidase activity leading to rapid conversion of tetrapeptide stems into tripeptide stems (Fig 7A and B).

MepA and MepK do not compensate the absence of MepM

In spite of the fact that MepA and MepK were previously shown to cleave 3→3 cross-links (Engel *et al*, 1992; Chodisetti & Reddy, 2019), growth of BW25113(*ycbB*, *relA'*) Δ *mepM* on ceftriaxone was not restored by overproduction of these enzymes (Fig 6). Thus, there was not a strict correlation between the ability of the endopeptidases to hydrolyze 3→3 cross-links *in vitro* and their ability to restore growth of BW25113(*ycbB*, *relA'*) Δ *mepM*. This absence of correlation was particularly striking for MepK since this endopeptidase, which preferentially hydrolyze 3→3 cross-links *in vitro* (Chodisetti & Reddy, 2019), did not complement the *mepM* deletion although it was required for growth of BW25113(*ycbB*, *relA'*) expressing the *ycbB* L,D-transpeptidase gene.

These results indicate that functional properties of the endopeptidases, beyond their mere hydrolytic specificity, are relevant to the bypass of the D,D-transpeptidase activity of PBPs by the L,D-transpeptidase activity of YcbB. These properties may include the interaction of the endopeptidases with other proteins that regulate their spatiotemporal activity (see Discussion section).

Endopeptidases of the PBP family do not compensate the absence of MepM

Complementation of the *mepM* deletion was not observed for PBP4, PBP7, or AmpH in the presence or absence of induction of the corresponding genes by L-rhamnose (Fig 6). There is a caveat for these

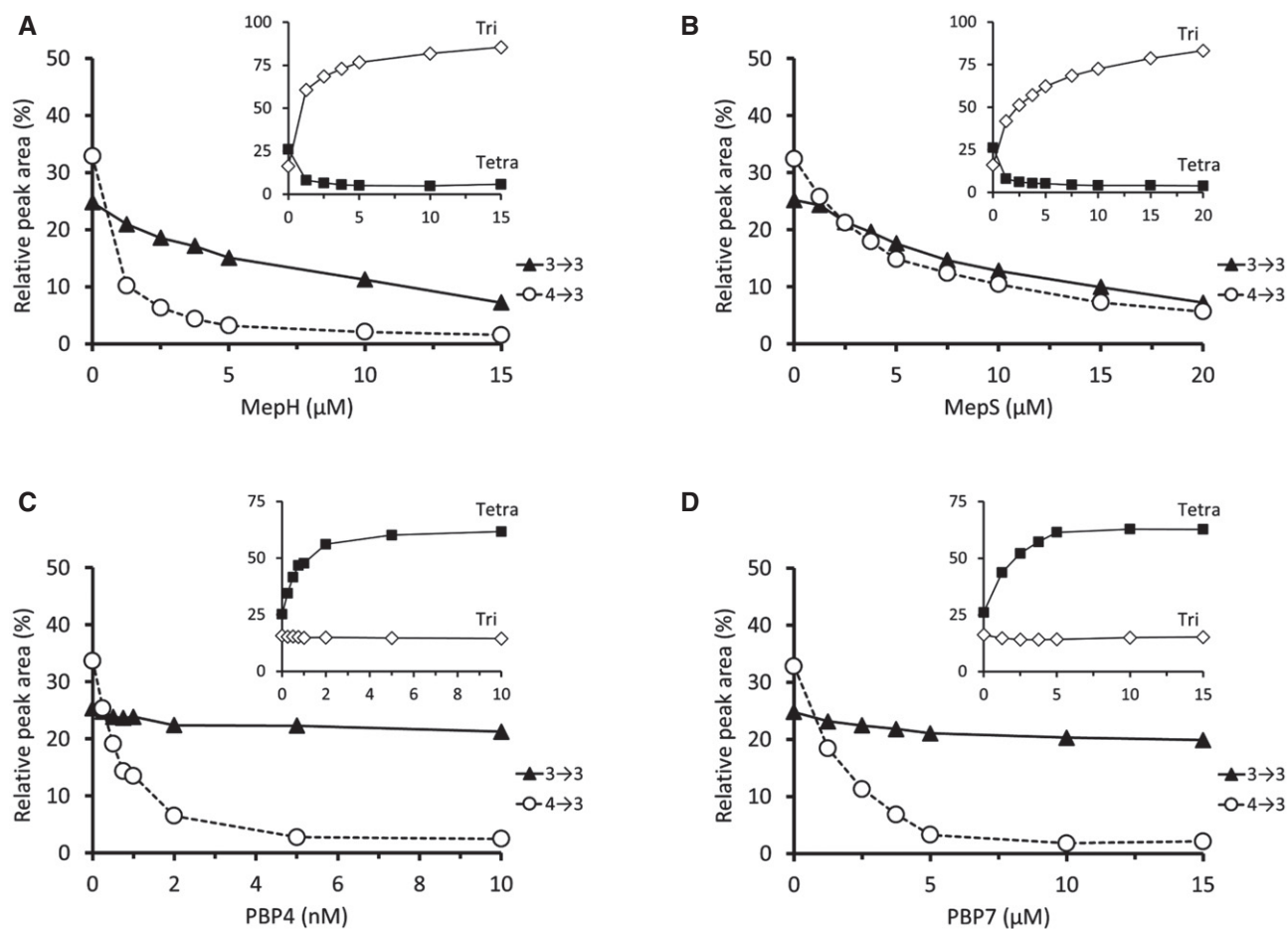


Figure 7. Hydrolysis of 4→3 and 3→3 cross-links by purified endopeptidases.

A–D Sacculi were incubated with lysozyme and purified MepH (A), MepS (B), PBP4 (C), and PBP7 (D). The relative peak areas of Tri-Tri and Tri-Tetra containing 3→3 cross-links and that of Tetra-Tri and Tetra-Tetra containing 4→3 cross-links were combined. MepH preferentially hydrolyzed dimers containing 4→3 cross-links. MepS hydrolyzed dimers containing 4→3 and 3→3 cross-links with similar efficiencies. PBP4 and PBP7 only hydrolyzed dimers containing 4→3 cross-links. The insets show variations in the relative peak areas of the Tri and Tetra monomers. MepH and MepS displayed L,D-carboxypeptidase activity, but not PBP4 and PBP7.

endopeptidases since they are potentially inhibited by ceftriaxone. To address this issue, the complementation test was repeated with ampicillin, cefsulodin, and aztreonam, which were reported to exhibit different selectivities for inhibition of the PBPs (Henderson *et al*, 1997; Kocaoglu & Carlson, 2015). Plasmids encoding PBP4, PBP7, and AmpH did not restore growth of BW25113 (*ycbB*, *relA'*) Δ *mepM* in the presence of ampicillin, cefsulodin, and aztreonam (Fig EV3) confirming that these endopeptidases are unable to compensate for the absence of MepM. PBP4 and PBP7 were purified and shown to only cleave 4→3 cross-links (Fig 7C and D). Thus, the absence of complementation of the *mepM* deletion by the plasmids encoding these PBPs can be accounted for by their lack of hydrolytic activities on 3→3 cross-linked dimers. PBP4 and PBP7 did not display L,D-carboxypeptidase activity.

Minimal complement of endopeptidases required for growth in the context of the formation of 4→3 cross-links by PBPs

Previous analyses based on multiple deletions showed that genes encoding endopeptidases belonging to the PBP family (PBP4, PBP7,

and AmpH) are collectively dispensable (Denome *et al*, 1999). Independently, deletion of the genes encoding MepH, MepM, and MepS in various combinations revealed that at least one of these endopeptidases was essential (Singh *et al*, 2012). Here, we extend these analyses to the full complement of the eight endopeptidase genes.

Serial deletions of endopeptidase genes were introduced into the chromosome of *E. coli* BW25113 Δ *relA* generating the lineages depicted in Appendix Fig S1. This approach culminated in the construction of a viable derivative of BW25113 Δ *relA*, designated Δ 7EDs (lineage 5 in Appendix Fig S1), which retained only one of the eight endopeptidase genes (*mepM*). Thus, MepM alone was necessary and sufficient to support bacterial growth in the context of the 4→3 mode of cross-linking.

Our next objective was to determine whether deletion of *mepM* could be complemented by overproduction of other endopeptidases. To address this question, the *mepM* gene was cloned under the L-rhamnose-inducible promoter of vector pHV30 and introduced into the Δ 7EDs strain. The chromosomal copy of *mepM* was deleted from the resulting strain leading to strain Δ 8EDs pHV53(*mepM*), which

was dependent upon the presence of L-rhamnose for growth (Fig 8A). The plasmids enabling L-arabinose-inducible expression of the eight endopeptidase genes (above) were introduced in the Δ 8EDs pHV53(*mepM*) strain to determine which endopeptidase could functionally replace MepM (Fig 8B). Induction by L-arabinose of the genes encoding MepM, MepH, MepS, and PBP7 suppressed the requirement for L-rhamnose for growth. These results indicate that a single endopeptidase, MepM, MepH, MepS, or PBP7 is potentially sufficient for growth in the context of the 4 \rightarrow 3 mode of cross-linking. Except for MepM, this required overproduction of the enzymes following induction of the P_{araBAD} promoter of the recombinant plasmids.

MepA and MepS compensate for the absence of MepK when *ycbB* is induced

The basal production of the YcbB L,D-transpeptidase encoded by plasmid pKT2(*ycbB*) in the absence of induction was found to be lethal in a derivative of BW25113 lacking *mepK* (above). To investigate the possibility that MepK might be replaced by another endopeptidase, the *ycbB* gene was cloned under the control of the P_{araBAD} promoter of vector pHV7 to obtain a lower level of expression of the L,D-transpeptidase gene. The resulting plasmid, pHV63 (*ycbB*), was successfully introduced into the BW25113 Δ *mepK* strain indicating that the basal level of expression of *ycbB* in the absence of induction was compatible with the absence of *mepK*. The disk diffusion assay revealed a clear zone around the disk containing L-arabinose indicating that induction of *ycbB* in the Δ *mepK* background prevented bacterial growth (Fig 9A). Plasmids for expression of each of the eight endopeptidases under the control of the P_{rhaBAD} promoter (above) were introduced in this strain (Fig 9B). Bacterial growth was observed in conditions of induction of *ycbB* by L-arabinose and of genes encoding MepA or MepS by L-rhamnose. This result indicates that the essential role of MepK for PG polymerization mediated by the YcbB L,D-transpeptidase was bypassed by overproduction of MepA or MepS.

Complementation of the *mepK* deletion by catalytically inactivated endopeptidases

Since overproduction of MepK, MepS, and MepA was found to complement the chromosomal deletion of the *mepK* gene (above, Fig 9), we focused on these three endopeptidases. Plasmids encoding catalytically inactive MepK H¹³³A, MepS C⁹⁴A, and MepA H¹¹³A were used to determine whether the endopeptidase activity of MepK, MepA, and MepS was required to compensate for the chromosomal deletion of *mepK*. Overproduction of the endopeptidases was tested in the Δ *mepK* background (single-deletion mutant retaining all chromosomal endopeptidase genes except *mepK*, Fig 10A) and in the Δ 7EDs background (seven-deletion mutant retaining only *mepM*, Fig 10B). Overproduction of MepK but not MepK H¹³³A was essential for growth in both backgrounds indicating that the catalytic activity of the endopeptidase was essential. Overproduction of MepS restored growth in both backgrounds but complementation by MepS C⁹⁴A was only observed in the Δ *mepK* single-deletion background. Since the periplasmic protease Prc hydrolyzes MepS (Singh et al, 2015), overproduction of MepS C⁹⁴A may saturate the protease enabling sufficient chromosomally-encoded MepS to

escape hydrolysis and support growth. Likewise, saturation of the Prc protease is likely to be responsible for the apparent complementation mediated by overproduction of MepA and MepA H¹¹³A since overproduction of these enzymes restored growth in the Δ *mepK* single-deletion background but not in the Δ 7EDs background. Together, these results indicate that MepS is the only endopeptidase that can compensate for the absence of MepK. This required overproduction of MepS. Alternatively, saturation of the Prc protease by overproduction of MepA, MepA H¹¹³A, or MepS C⁹⁴A prevented hydrolysis of MepS produced at a lower level from the native chromosomal *mepS* gene.

Minimal complement of endopeptidases required for growth in the presence of β -lactams in the context of the exclusive formation of 3 \rightarrow 3 cross-links by the YcbB L,D-transpeptidase

As previously described (Hugonnet et al, 2016), induction of *relA'* led to mecillinam resistance in BW25113(*ycbB*, *relA'*), whereas induction of both *ycbB* and *relA'* was required for ampicillin and ceftriaxone resistance (Table 1 and Fig EV4). Strain BW25113(*ycbB*, *relA'*) Δ 6EDs (harboring only *mepM* and *mepK*) was also resistant to the three β -lactams upon induction of *ycbB* and *relA'* indicating that 6 of the 8 endopeptidase genes were dispensable for expression of β -lactam resistance. In contrast to BW25113(*ycbB*, *relA'*), the Δ 6EDs derivative was resistant to ampicillin and ceftriaxone in the absence of induction of *ycbB* by IPTG. The basal level of *ycbB* expression in the absence of induction was required for resistance since susceptibility to ampicillin and ceftriaxone was observed in the absence of pKT2(*ycbB*). These observations indicate that deletion of 6 of the 8 endopeptidase genes was associated with a decrease in the level of expression of *ycbB* required for β -lactam resistance. In combination with the analysis based on single-gene deletions (Fig 2B), these results show that MepM and MepK are necessary and sufficient for bacterial growth in conditions in which YcbB is the only functional transpeptidase.

Mutations impairing the lytic transglycosylase activity of Slt70 favors YcbB-mediated PG synthesis

Although BW25113(*ycbB*, *relA'*) displays high β -lactam resistance on BHI agar supplemented with IPTG and L-arabinose, the strain was found to remain susceptible to β -lactams in BHI broth supplemented with the same inducers. Mutations leading to expression of β -lactam resistance in liquid medium were sought by selecting mutants derived from *E. coli* BW25113 M1 (Hugonnet et al, 2016). The latter strain overexpresses *ycbB* from plasmid pJEH12(*ycbB*) in response to induction by IPTG and overproduces the (p)ppGpp alarmone due to impaired expression of the isoleucine tRNA synthetase gene *ileS* (Hugonnet et al, 2016). Derivatives of BW25113 M1 were selected in BHI broth containing 16 μ g/ml ampicillin and 50 μ M IPTG. Four independent mutants derived from BW25113 M1 (M1.1 to M1.4) were isolated and shown to grow in liquid medium supplemented with ampicillin and IPTG (Fig 11A). Whole genome sequencing revealed single mutations all located in the *sltY* gene encoding the lytic transglycosylase Slt70 (Table 2). One of the mutants (M1.3) most probably harbored a null allele of *sltY* since a 7-bp deletion introduced a frameshift at the 9th codon of the gene. To confirm this conclusion, the *sltY* gene

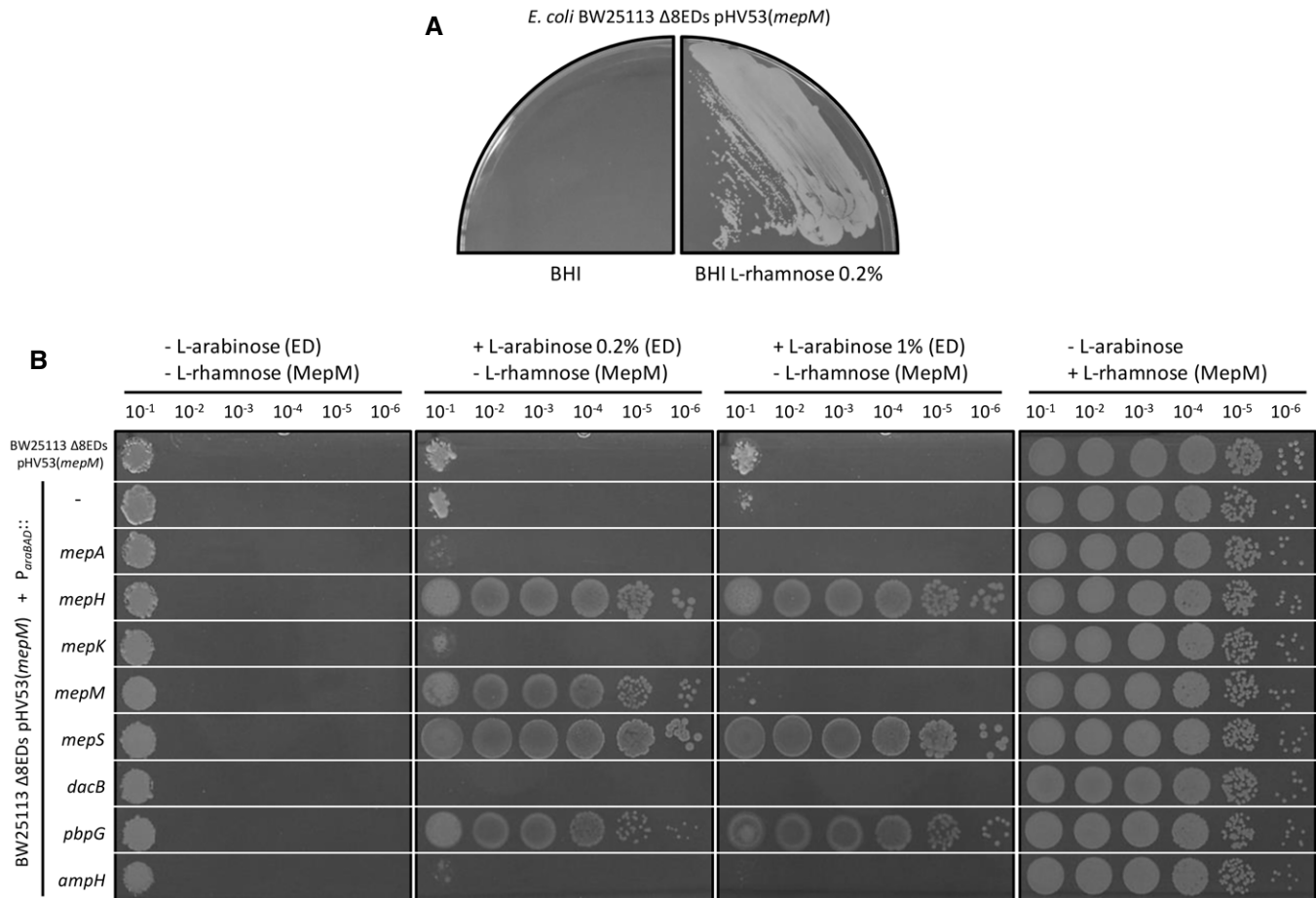


Figure 8. Minimal complement of endopeptidases required for growth in the context of the formation of 4→3 cross-links by PBPs.

- A** BW25113 Δ 8EDs harboring a plasmid carrying the *mepM* gene under the control of the P_{rhaBAD} L-rhamnose-inducible promoter with the “weak” TIS2 translation initiation signal (plasmid pHV53) was grown on BHI agar in the absence or presence of 0.2% L-rhamnose. Growth was dependent upon induction of the *mepM* copy carried by pHV53.
- B** The plating efficiency assay was performed with derivatives of BW25113 Δ 8EDs pHV53(*mepM*) harboring the vector pHV7 or recombinant plasmids carrying each of the eight endopeptidase genes under the control of the P_{araBAD} promoter. In this assay, functional replacement of MepM is detected based on growth in media containing 0.2% or 1% L-arabinose for expression of the endopeptidase gene carried by vector pHV7, thereby by-passing the requirement for induction of the *mepM* copy of pHV53 by L-rhamnose. Complementation was observed with both concentrations of inducer for *mepH*, *mepS*, and *pbpG*. Overproduction of *mepM* encoded by the pHV7 derivative in the presence of the high dose of L-arabinose (1%) was lethal. The right panel presents the growth control performed in the presence of 0.2% L-rhamnose for induction of the *mepM* copy carried by pHV53.

was deleted from the chromosome of BW25113(*ycbB*, *relA'*) strain. The resulting strain, BW25113(*ycbB*, *relA'*) Δ *slyT*, was also resistant to ceftriaxone in liquid medium in the presence of IPTG and L-arabinose (Fig 11A).

Comparison of the resistance phenotype of BW25113(*ycbB*, *relA'*) and its Δ *slyT* derivative on BHI agar revealed that induction of *ycbB* by IPTG is required for ampicillin and ceftriaxone resistance in the former but not in the latter strain (Fig 11B for representative antibiograms and Table 3 for the full set of data). Expression of resistance to ampicillin and ceftriaxone on BHI agar remained dependent upon induction of *relA'* since BW25113 Δ *relA* Δ *slyT* pKT2(*ycbB*) pKT8 (*relA'*) remained susceptible to these drugs in the absence of L-arabinose. Expression of resistance to ampicillin and ceftriaxone also remained dependent upon the presence of pKT2(*ycbB*) since

replacement of this plasmid by the pHV6 vector abolished resistance [strain BW25113 Δ *relA* Δ *slyT* pHV6 pKT8(*relA'*); Table 3]. These results indicate that loss of Slt70 enabled expression of YcbB-mediated β -lactam resistance in liquid medium and reduced the level of production of the YcbB L,D-transpeptidase required for expression of resistance to ampicillin and ceftriaxone on solid medium. This observation suggests that accumulation of uncross-linked glycan chains in the absence of Slt70 may improve the capacity of YcbB to catalyze PG cross-linking accounting for the lower level of expression of *ycbB* required for resistance.

For the sake on completeness, we also noticed that BW25113 Δ *relA* Δ *slyT* pKT2(*ycbB*) pKT8(*relA'*) expressed intermediate resistance to ceftriaxone in the presence of IPTG (induction of *ycbB*) and in the absence of L-arabinose (no induction of *relA'*) because the

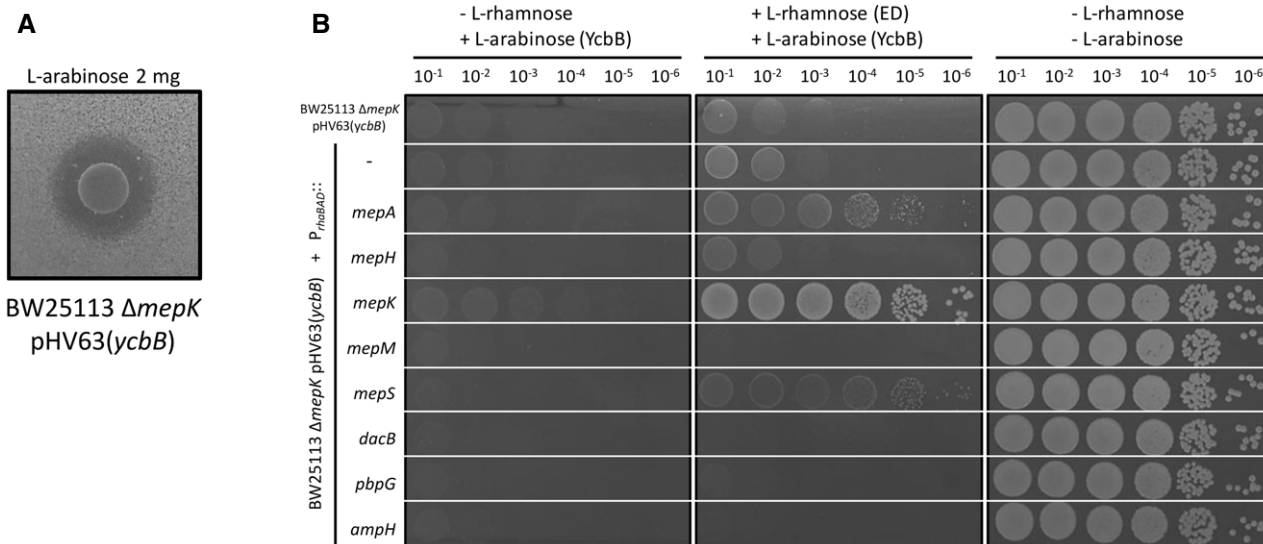


Figure 9. Complementation of the *mepK* deletion by plasmids encoding L-rhamnose-inducible copies of the eight endopeptidase genes.

A Induction of *ycbB* under the control of the P_{araBAD} promoter in BW25113 $\Delta mepK$ pHV63(*ycbB*) was studied by the disk diffusion assay. The clear zone around the disk containing L-arabinose indicates that production of YcbB inhibited growth.
 B Functional complementation of the *mepK* deletion of BW25113 $\Delta mepK$ pHV63(*ycbB*) was performed with the pHV30 vector or recombinant plasmids encoding each of the eight endopeptidases under the control of the P_{rhaBAD} promoter. Induction of *ycbB* and of endopeptidase (ED) genes was performed with 0.2% L-arabinose and 1% L-rhamnose, respectively. BHI agar plates contained chloramphenicol (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to counter-select loss of pHV63(*ycbB*).

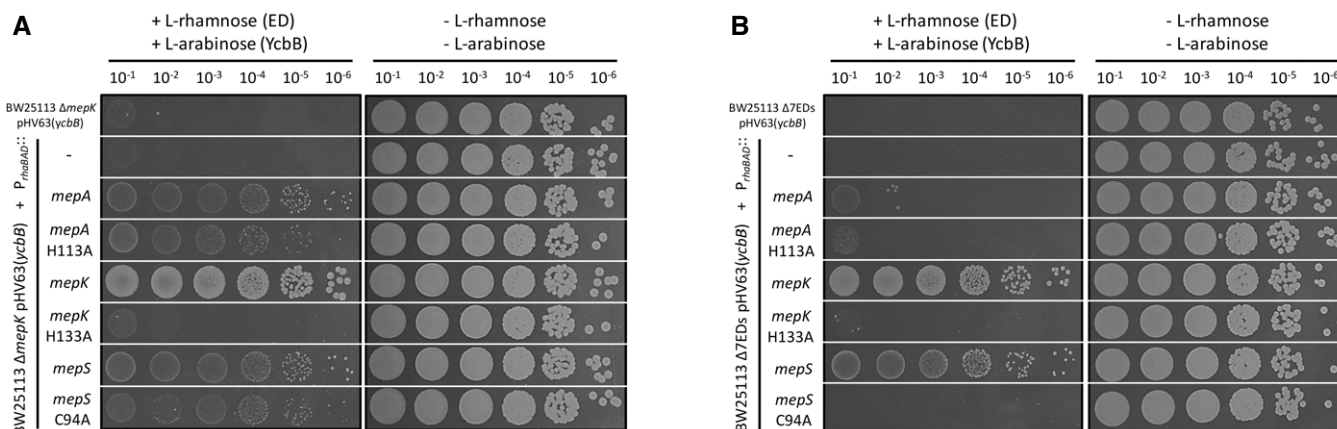


Figure 10. Complementation of *mepK* deletion with catalytically inactivated endopeptidases.

A Functional complementation of the *mepK* deletion of BW25113 $\Delta mepK$ pHV63(*ycbB*) was performed with the pHV30 vector or recombinant plasmids encoding *mepA*, *mepK*, *mepS*, or derivatives encoding catalytically inactive endopeptidases under the control of the P_{rhaBAD} promoter.
 B The complementation assay was repeated for BW25113 $\Delta 7EDs$ pHV63(*ycbB*), which was obtained by deletion of all chromosomal endopeptidase genes except *mepM*. Induction of *ycbB* and of endopeptidase (ED) genes was performed with 0.2% L-arabinose and 1% L-rhamnose, respectively. BHI agar plates contained chloramphenicol (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to counter-select loss of pHV63(*ycbB*).

size of the inhibition zone (26 mm) was intermediate between those of susceptible and resistant strains (range of 32–36 mm versus 9–15 mm) (Table 3). This phenotype was independent from *relA'* since replacement of plasmid pKT8(*relA'*) of BW25113 $\Delta relA$ ΔstY pKT2(*ycbB*) pKT8(*relA'*) by the vector pHV7 also led to intermediate resistance to ceftriaxone in the presence of IPTG for induction of *ycbB* (25 mm).

Discussion

Endopeptidases are essential for expansion of sacculi

PG polymerization requires a combination of synthetases, the transpeptidases and the glycosyltransferases, in addition to hydrolases that fulfill two essential roles. Since PG is a net-like

Table 1. YcbB-mediated β-lactam resistance in BW25113 derivatives harboring all endopeptidase genes or only *mepM* and *mepK* (Δ6EDs).

Host	Plasmid	Inducer ^b	Inhibition zones (mm) ^a		
			Mec	Amp	Cro
BW25113 Δ <i>relA</i>					
	pKT2(<i>ycbB</i>) pKT8(<i>relA'</i>)	None	20	18	34
		IPTG (<i>ycbB</i>)	21	16	32
		Ara (<i>relA'</i>)	9	18	35
		IPTG + Ara	< 8	< 8	15
BW25113 Δ <i>relA</i> Δ6EDs					
	pKT2(<i>ycbB</i>) pKT8(<i>relA'</i>)	None	19	22	37
		IPTG (<i>ycbB</i>)	20	19	35
		Ara (<i>relA'</i>)	< 8	10	18
		IPTG + Ara	< 8	< 8	16
BW25113 Δ <i>relA</i> Δ6EDs					
	pHV6 ^c pKT8(<i>relA'</i>)	None	22	18	35
		IPTG	22	18	35
		Ara (<i>relA'</i>)	10	18	37
		IPTG + Ara	9	17	37

^aThe diameter of inhibition zones was determined by the disk diffusion assay around disks containing 10 μg mecillinam (Mec), 10 μg ampicillin (Amp), or 30 μg ceftriaxone (Cro). Data are the medians from three experiments. Examples of the original results are presented in Fig EV4.

^bThe *ycbB* and *relA'* genes carried by plasmid pKT2 and pKT8 were induced with 40 μM IPTG and 1% L-arabinose (Ara), respectively.

^cpHV6 is the vector used for construction of pKT2(*ycbB*).

Table 2. Mutations detected in the *sltY* gene of mutants BW25113 M1.1 to M1.4.

Mutant	Position	Mutation	Impact ^a
M1.1	4,621,672	C→T	Gln ³⁷⁵ stop
M1.2	4,622,297	Duplication of AGG: CAGGG→CAGGAGGG	Insertion of Gly position 584 (codon GGN)
M1.3	4,620,572	7-bp deletion: CCTGGCGGC→CC	Trp ⁹ frameshift
M1.4	4,621,507	C→T	Arg ³²⁰ stop

^aSlT70 comprises 645 amino acid residues.

macromolecule completely surrounding the cytoplasmic membrane, it seems clear that insertion of new disaccharide peptide subunits into the growing cell wall requires cleavage of covalent bonds (Höltje & Heidrich, 2001; Vollmer, 2012). The stress-bearing PG being present during the entire cell cycle, it is also obvious that PG hydrolases are required to split daughter cells following completion of septum synthesis (Heidrich *et al*, 2002). Some of these hydrolases generate PG fragments that are imported into the cell and recycled, a complex pathway that is not essential for growth in laboratory conditions but bears important roles in (i) minimizing energy costs, (ii) sensing the appropriate balance between synthetic and hydrolytic activities, which may be altered by β-lactam antibiotics and other toxic agents, and (iii) avoiding the release of proinflammatory molecules recognized by the host immune system (Johnson *et al*, 2013; Bastos *et al*, 2021). PG hydrolases specifically acting on each of the ten amide, ether, and glycosidic bonds present in the PG poly-

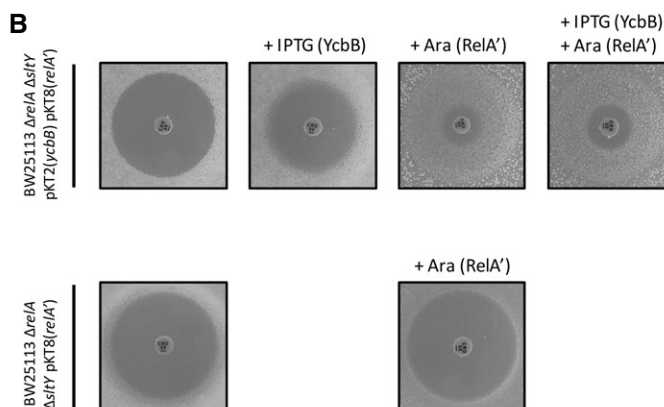
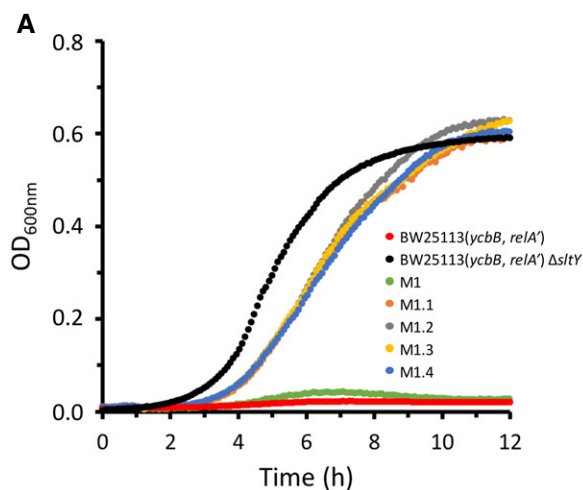


Figure 11. Growth phenotype of *sltY* mutants.

A Growth curves of (i) BW25113(*ycbB*, *relA'*) and its Δ*sltY* derivative; and (ii) strain M1 and its derivatives (M1.1 to 1.4) harboring mutations in *sltY*. The growth medium contained (i) 40 μM IPTG, 1% L-arabinose, and 8 μg/ml ceftriaxone for BW25113(*ycbB*, *relA'*) and its Δ*sltY* derivative or (ii) 50 μM IPTG and 16 μg/ml ampicillin for M1 and its derivatives.

B Ceftriaxone-resistance depends upon *ycbB* and *relA'* expression. The disk diffusion assay was performed with BW25113 Δ*relA* Δ*sltY* harboring pKT2(*ycbB*) and pKT8 (*relA'*) or pKT8(*relA'*) only. Induction was performed with 40 μM IPTG and 1% L-arabinose for *ycbB* and *relA'*, respectively. Disks were loaded with 30 μg of ceftriaxone.

Table 3. YcbB-mediated β -lactam resistance in BW25113(*ycbB*, *relA'*) and its derivative obtained by deletion of *sltY*.

Host	Plasmid	Inducer ^b	Inhibition zones (mm) ^a		
			Mec	Amp	Cro
BW25113 Δ <i>relA</i>					
	pKT2(<i>ycbB</i>) pKT8(<i>relA'</i>)	None	20	18	34
		IPTG (<i>ycbB</i>)	21	16	32
		Ara (<i>relA'</i>)	9	18	35
		IPTG + Ara	< 8	< 8	15
BW25113 Δ <i>relA</i> Δ <i>sltY</i>					
	pKT2(<i>ycbB</i>) pKT8(<i>relA'</i>)	None	21	21	33
		IPTG (<i>ycbB</i>)	22	18	26
		Ara (<i>relA'</i>)	< 8	< 8	9
		IPTG + Ara	< 8	< 8	12
BW25113 Δ <i>relA</i> Δ <i>sltY</i>					
	pHV6 ^c pKT8(<i>relA'</i>)	None	20	22	34
		IPTG	22	22	34
		Ara (<i>relA'</i>)	< 8	21	36
		IPTG + Ara	< 8	20	35
BW25113 Δ <i>relA</i> Δ <i>sltY</i>					
	pKT2(<i>ycbB</i>) pHV7 ^d	None	23	21	34
		IPTG (<i>ycbB</i>)	25	18	25
		Ara	25	21	34
		IPTG + Ara	24	17	26

^aThe diameter of inhibition zones was determined by the disk diffusion assay around disks containing 10 μ g mecillinam (Mec), 10 μ g ampicillin (Amp), or 30 μ g ceftriaxone (Cro). Data are the medians from three experiments.

^bThe *ycbB* and *relA'* genes carried by plasmid pKT2 and pKT8 were induced with 40 μ M IPTG and 1% L-arabinose (Ara), respectively.

^cpHV6 is the vector used for construction of pKT2(*ycbB*).

^dpHV7 is the vector used for construction of pKT8(*relA'*).

mer have been described and most cleavage specificities involve multiple enzymes (Fig EV5A). Enzymes of different specificities can at least in part compensate for each other, e.g., lytic glycosyltransferases and amidases both contribute to the separation of daughter cells (Heidrich *et al*, 2002; van Heijenoort, 2011). In this study, we show that endopeptidases are specifically required for bacterial growth not only in the context of the formation of 4 \rightarrow 3 cross-links by PBPs but also in the context of the formation of 3 \rightarrow 3 cross-links by YcbB (Table 4). We also identify for the first time the minimum sets of endopeptidases for each mode of PG cross-linking, namely MepM for 4 \rightarrow 3 cross-links and MepM plus MepK for 3 \rightarrow 3 cross-links. Endopeptidase overproduction resulting from expression of the genes under the control of heterologous promoters revealed potential functional redundancies in the endopeptidase families. In particular, overproduction of MepH, MepS, or PBP7 compensated for the absence of MepM in the context of a 4 \rightarrow 3 cross-linked PG (Fig 12A). Overproduction of MepS compensated for the absence of MepM or MepK for growth with a 3 \rightarrow 3 cross-linked PG. Overproduction of MepM prevented growth probably due to unbalanced synthesis and hydrolysis of PG cross-links (observed for both 4 \rightarrow 3

and 3 \rightarrow 3 cross-linked PG). Production of catalytically inactive endopeptidases suggested that MepA and MepS are negatively regulated by Prc-mediated proteolysis, as previously established for MepS (Singh *et al*, 2015; Lai *et al*, 2017). In conclusion, MepK is specifically required for growth if the peptidoglycan contains a large proportion of 3 \rightarrow 3 cross-links, while MepM is additionally required for β -lactam resistance, unless it is the only endopeptidase remaining, in which case it is also required for growth in the absence of the drug.

Specificity of purified endopeptidases for 4 \rightarrow 3 and 3 \rightarrow 3 cross-links

The cleavage specificity of the endopeptidases was determined by mass spectrometry (Figs 5 and 7, Appendix Fig S2). Endopeptidases of the PBP family were specific to 4 \rightarrow 3 cross-links. Endopeptidases belonging to other families cleaved both 4 \rightarrow 3 and 3 \rightarrow 3 cross-links with similar efficacies (MepM, MepS, MepA) or with a preference for 4 \rightarrow 3 (MepH) or 3 \rightarrow 3 (MepK) cross-links (Figs 5 and 7) (Engel *et al*, 1992; Chodisetti & Reddy, 2019). This is unexpected since 4 \rightarrow 3 and 3 \rightarrow 3 cross-links contain amide bonds connecting two R stereocenters (D-Ala⁴ \rightarrow DAP³) or an S to an R stereocenter (DAP³ \rightarrow DAP³), respectively (Fig EV5A). This could imply that endopeptidases of the Mep families mainly interact with the acceptor stems of cross-linked muropeptides, which are the same for both types of cross-links, whereas endopeptidases of the PBP family interact with a donor tetrapeptide stem only present in 4 \rightarrow 3 cross-linked muropeptides (Fig EV5B).

Integration of endopeptidases into the global regulation of 4 \rightarrow 3 and 3 \rightarrow 3 PG cross-linking

D,D-carboxypeptidases, which cleave off the terminal residue (D-Ala⁵) of pentapeptide stems, are thought to negatively control the transpeptidase activity of PBPs since these enzymes require a pentapeptide donor (Fig 1). A less studied impact of D,D-carboxypeptidases is the formation of the essential tetrapeptide donor substrate of the LDTs, except for two publications reporting that PBP5 and PBP6a are essential for YcbB-mediated β -lactam resistance and for rescue of a defect in lipopolysaccharide synthesis, respectively (Hugonnet *et al*, 2016; Morè *et al*, 2019). Thus, D,D-carboxypeptidases have crucial roles in controlling the relative contributions of transpeptidases of the D,D and L,D specificities to PG cross-linking by both decreasing access of PBPs to pentapeptide stems and increasing access of LDTs to tetrapeptide stems.

Endopeptidases participate in the metabolism of PG cross-links in several ways. MepH and MepS display L,D-carboxypeptidase activity leaving tripeptides as the main (> 80%) end product of *in vitro* PG hydrolysis (Fig 7). This activity may negatively control the L,D-transpeptidase activity of YcbB by hydrolysis of D-Ala⁴, thereby preventing access to its tetrapeptide donor. In addition, hydrolysis of 4 \rightarrow 3 cross-linked Tetra \rightarrow Tetra and Tetra \rightarrow Tri dimers by the endopeptidases generates free tetrapeptide stems (Figs 5 and 7). These tetrapeptide stems can be used as donor by YcbB for formation of 3 \rightarrow 3 cross-links, as demonstrated for the LDTs of *Mycobacterium smegmatis* (Baranowski *et al*, 2018). In contrast, the D,D-transpeptidase activity of PBPs exclusively requires pentapeptide-containing donors. Analyses of peptidoglycan structure indicate that

Table 4. Characteristics of the endopeptidases.

Endopeptidase	<i>In vitro</i> hydrolysis of 4→3 and 3→3 cross-links ^c	Role in the context of the two modes of cross-linking (revealed by endopeptidase overproduction ^f)	
		4→3 cross-links	3→3 cross-links
Acyl-serine transferase			
PBP4 ^a	4→3	Not essential (None)	Not essential (None)
PBP7 ^a	4→3	Not essential (Compensates for the absence of MepM)	Not essential (None)
AmpH ^b	4→3 ^d	Not essential (None)	Not essential (None)
NlpC/P60 peptidase			
MepH ^a	4→3 > 3→3 L,D-carboxypeptidase	Not essential (Compensates for the absence of MepM)	Not essential (None)
MepS ^a	4→3 = 3→3 L,D-carboxypeptidase	Not essential (Compensates for the absence of MepM)	Not essential (Compensates for the absence of MepM or MepK) ^e
Lysostaphin/M23 peptidase			
MepM ^a	4→3 = 3→3	Sufficient (Prevents growth)	Essential (Prevents growth)
LAS metallopeptidase			
MepA ^b	4→3 = 3→3	Not essential (None)	Not essential (None)
M15 peptidase			
MepK ^b	4→3 < 3→3	Not essential (None)	Essential (None)

^aCharacterized in this study.

^bData from the literature (Engel *et al*, 1992; Gonzalez-Leiza *et al*, 2011; Chodiseti & Reddy, 2019).

^cMepM, MepS, and MepA cleaved 4→3 and 3→3 cross-links with similar efficacies (4→3 = 3→3). MepH and MepK displayed a preference for 4→3 cross-links (4→3 > 3→3) or for 3→3 cross-links (4→3 < 3→3), respectively. L, D-carboxypeptidase, hydrolysis of the DAP³-D-Ala⁴ amide bond of tetrapeptide stems.

^dHydrolysis of 3→3 cross-links was not tested.

^eReplacement of both MepM and MepK by MepS was not tested.

^fNone, no phenotype associated with endopeptidase overproduction.

D-Ala⁵ is rapidly cleaved off from pentapeptide stems by D,D-carboxypeptidases if they are not used for formation of 4→3 cross-links (Glauner *et al*, 1988). These observations suggest that the transpeptidase activity of PBPs exclusively relies on *de novo* synthesis and translocation of pentapeptide-containing subunits. Thus, YcbB is expected to function as a rescue enzyme to restore cross-linking in regions of the PG that are compromised by 4→3 or 3→3 endopeptidases. This mechanism was proposed for PG repair

following disassembly of the lipopolysaccharide export machinery that crosses the PG layer (Morè *et al*, 2019). The combined activities of endopeptidases cleaving 4→3 cross-links and of L,D-transpeptidases could contribute to the enrichment in 3→3 cross-links in stationary phase cultures (Pisabarro *et al*, 1985). In turn, this enrichment may protect cells from hydrolases active on 4→3 cross-linked PG. Previous analyses proposed that two L,D-transpeptidases may contribute to the enrichment of PG in 3→3 cross-links, namely YcbB (LdtD), which is induced by the cell envelope Cpx stress system, and YnhG (LdtE), which is expressed under the control of sigma S and induced in stationary phase (Weber *et al*, 2005; Delhayé *et al*, 2016).

Participation of YcbB to PG polymerization complexes

PG polymerization is generally thought to be performed by two multiprotein complexes involved in the expansion of the lateral cell wall (elongasome) and in the formation of the septum (divisome) (Pazos *et al*, 2017). Replacement of the D,D-transpeptidase activity of all PBPs by the L,D-transpeptidase activity of YcbB raises several questions regarding the identity of the partners of YcbB for the assembly of lateral wall and septum PG, and whether YcbB physically replaces PBPs in the PG polymerization complexes. Our data support a model in which YcbB functions with two different sets of partners for lateral wall and septum PG assembly as follows.

For the assembly of lateral wall PG, inactivation of the transpeptidase domain of PBP2 by β -lactams leads to uncoupling of the glycosyltransfer and transpeptidation reactions, the former being most probably catalyzed by RodA (Uehara & Park, 2008; Cho *et al*, 2014) (Fig 12B). Uncross-linked glycan chains accumulate in the periplasm and are eventually cleaved by the Slt70 lytic transglycosylase and recycled. According to the model presented in Fig 12, and in agreement with a previous study (Cho *et al*, 2014), the reactions catalyzed by Slt70 and YcbB occur in competition implying that YcbB-mediated cross-linking is not coupled to glycan chain polymerization by RodA. This also implies that YcbB could function in the PG layer in combination with the MepM endopeptidase known to participate in cell elongation (Uehara *et al*, 2009; Singh *et al*, 2012; Banzhaf *et al*, 2020; Truong *et al*, 2020). In agreement with this model, impaired Slt70 activity had a positive impact on β -lactam resistance mediated by YcbB (Fig 12C). This was established both by the selection of mutations enabling expression of β -lactam resistance in liquid medium, which mapped in the *sltY* gene encoding Slt70 (Table 2) and by the deletion of *sltY*, which lowered the level of *ycbB* expression required for resistance (Fig 11).

For the assembly of septum PG, YcbB was proposed to cooperate with the glycosyltransferase activity of Class A PBP1b (Hugonnet *et al*, 2016; Caveney *et al*, 2019). In support of this hypothesis, microscale thermophoresis experiment revealed that purified YcbB interacts with PBP1b and PBP5 (D,D-carboxypeptidase). Furthermore, the glycosyltransferase activity of PBP1b is essential for YcbB-mediated β -lactam resistance, whereas the combined deletion of class A PBP1a and PBP1c had no impact. We cannot rule out the possibility that the glycosyltransferase activity of FtsW also contributes to septum PG polymerization in the presence of β -lactams but this would require that the inactivation of PBP3 by β -lactams lead to the uncoupling of glycan chain polymerization and PG cross-linking, as proposed for the RodA-PBP2 complex (see above). This

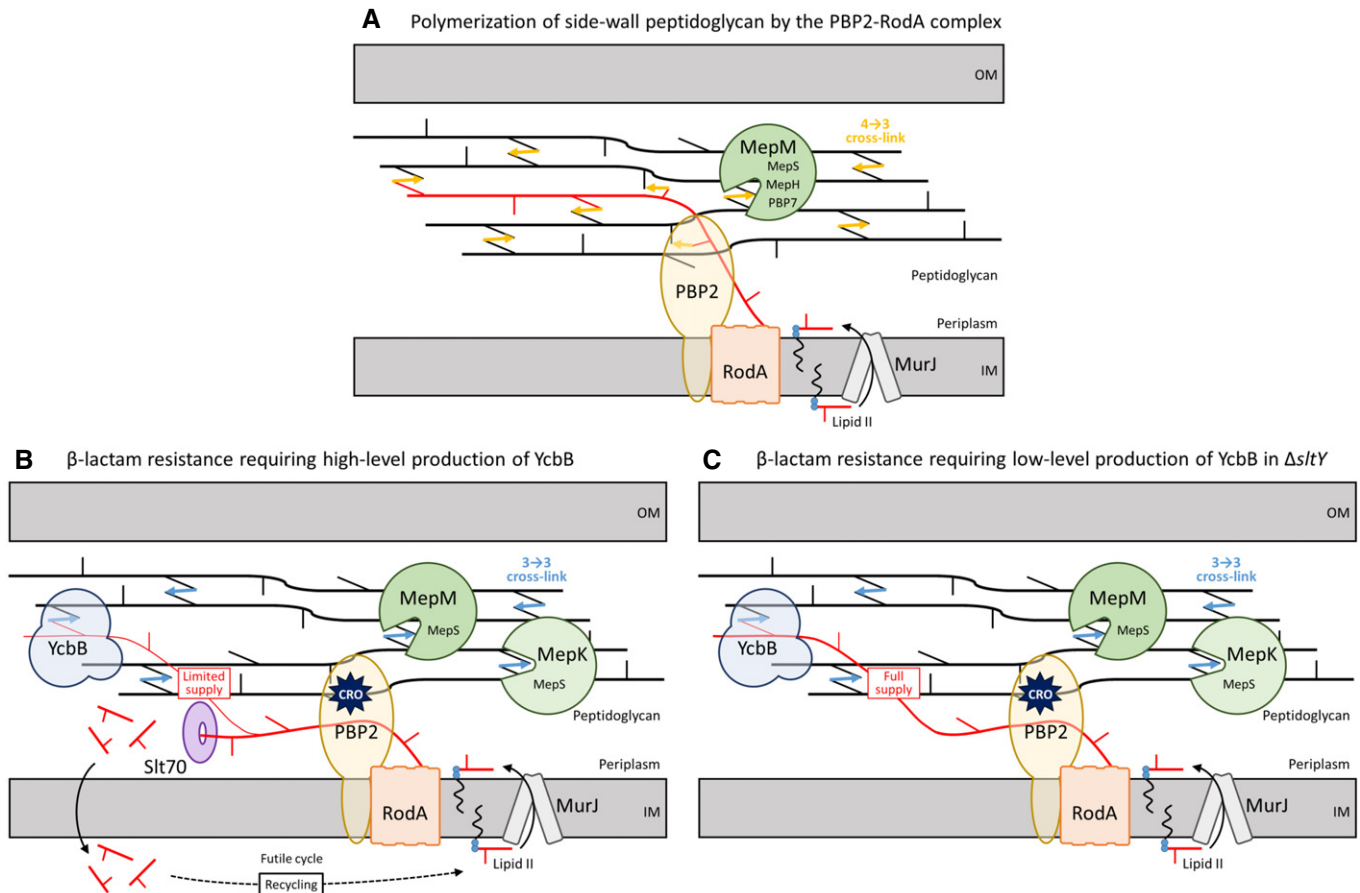


Figure 12. Proposed model for polymerization of side wall PG by transpeptidases of the D,D or L,D specificity.

- A In wild-type cells, the disaccharide pentapeptide subunit linked to the undecaprenyl lipid transporter (Lipid II) is translocated to the outer leaflet of the cytoplasmic membrane by MurJ and polymerized by the glycosyltransferase and D,D-transpeptidase activities of the RodA-PBP2 complex. MepM is essential and sufficient for insertion of new material in the PG net, although this endopeptidase can be replaced by overproduction of MepH, MepS, or PBP7.
- B Inhibition of PBP2 by β -lactams leads to the accumulation of uncross-linked glycan chains that are cleaved by the Slt70 lytic transglycosylase. This limits the supply of glycan chains for cross-linking by the YcbB L,D-transpeptidase. Under this condition, MepM or overproduction of MepS is required for insertion of new glycan strands. Production of YcbB leads to a requirement for an additional endopeptidase, MepK. This function of MepK can be bypassed by overproduction of MepS.
- C Deletion of the *slt70* gene encoding lytic transglycosylase Slt70 prevents digestion of uncross-linked glycan chains leading to a full supply of neo-synthesized glycan chains to YcbB and improved expression of β -lactam resistance. IM, inner membrane; OM, outer membrane; CRO, ceftriaxone.

is not supported by the analyses of PG recycling in conditions of selective inhibition of PBP3 by aztreonam (Uehara & Park, 2008). The endopeptidases involved in septum formation have not been identified, except for a contribution of PBP4, which has an effect on the timing of septation (preprint: Verheul *et al*, 2020). MepK is a candidate for this function in 3→3 cross-linked PG although this is currently not supported by experimental evidence, and it remains to be seen if endopeptidases are needed for septum PG synthesis.

Materials and Methods

Strains, plasmids, and growth conditions

All strains were derived from *E. coli* BW25113 (Baba *et al*, 2006). The origin and characteristics of plasmids are listed in

Appendix Table S1. The origin and genotype of strains are listed in Appendix Table S2. Bacteria were grown in brain heart infusion (BHI; Difco) broth or agar at 37°C unless otherwise specified. Liquid cultures were performed with aeration (180 rpm). The growth media were systemically supplemented with drugs to counter-select plasmid loss (Appendix Table S1). The same drugs at the same concentrations were used to select transformants. Kanamycin at 50 μ g/ml was used for the Km^R cassette. Induction of the *lacZYA*, *araBAD*, and *rhaBAD* promoters was performed with isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, 40 or 50 μ M), L-arabinose (0.2 or 1%), and L-rhamnose (0.2 or 1%), respectively. Plasmids constructed in this study were obtained by using NEBuilder HiFi DNA assembly (New England Biolabs) method, unless otherwise specified.

Growth curves were obtained in a 96-well plate using an Infinite 200 PRO microplate reader (TECAN). Briefly, bacteria were grown

to the late exponential phase, i.e., to an optical density at 600 nm (OD_{600}) greater than 1.0 (ca. 6 h at 37°C under agitation). The OD_{600} was adjusted to 1.0, and 5 μ l were inoculated in 195 μ l of BHI broth supplemented with drugs and inducers, as specified in the legends to figures. Growth was monitored at 600 nm every 5 min for 12 h at 37°C with vigorous shaking.

Construction of *E. coli* strains carrying gene deletions

The Keio collection comprises 3,985 mutants obtained by replacement of non-essential genes by a kanamycin resistance (Km^R) cassette (Baba *et al.*, 2006). P1 transduction of the Km^R cassette from selected mutants was used to introduce deletions of specific genes involved in PG synthesis (Datsenko & Wanner, 2000). For multiple gene deletions, the Km^R cassette was removed by the FLT recombinase encoded by plasmid pCP20. The presence of the expected deletions was confirmed by PCR amplification at each deletion step. Appendix Fig S1 shows lineages that have been obtained by parallel serial deletions.

To study the 3→3 mode of cross-linking, plasmid pKT2(*ycbB*) and pKT8(*relA'*) were introduced into the derivatives of *E. coli* BW25113 Δ *relA* obtained by deletion of various combinations of endopeptidase genes. For the sake of simplicity, the latter strains were referred to as BW25113(*ycbB*, *relA'*) derivatives even though gene deletions preceded the introduction of pKT2 (*ycbB*) and pKT8(*relA'*).

Construction of *E. coli* BW25113 Δ *relA* Δ 8EDs

The plasmid pHV53(P_{thaBAD^-} -TIS2-*mepM*) was introduced into BW25113 Δ *relA* Δ 7EDs harboring *mepM* as the only chromosomal endopeptidase-encoding gene. The *mepM* deletion was introduced into BW25113 Δ *relA* Δ 7EDs pHV53(P_{thaBAD^-} -TIS2-*mepM*) in the presence of 0.2% L-rhamnose by P1 transduction as described above. Growth of the resulting BW25113 Δ *relA* Δ 8EDs pHV53(P_{thaBAD^-} -TIS2-*mepM*) strain was dependent on the induction of the plasmid copy of *mepM* mediated by L-rhamnose.

Mutant selection and whole-genome sequencing

E. coli BW25113 M1 was streaked for isolated colonies on agar plates containing 10 μ g/ml tetracycline to counter-select loss of plasmid pJEH12(*ycbB*). The selection procedure was independently carried out starting with four independent colonies. Briefly, 5 ml of BHI broth supplemented with 10 μ g/ml tetracycline and 50 μ M IPTG were inoculated with a colony. Bacteria were grown overnight with shaking (180 rpm). A fraction of 1 ml of the culture was inoculated in 250 ml of BHI broth supplemented with 16 μ g/ml ampicillin and 50 μ M IPTG. Bacteria were grown overnight with shaking and streaked on BHI agar containing 16 μ g/ml ampicillin and 50 μ M IPTG. A colony was inoculated in 250 ml of BHI broth supplemented with 16 μ g/ml ampicillin and 50 μ M IPTG. Bacteria were grown overnight with shaking and streaked on BHI agar containing 16 μ g/ml ampicillin and 50 μ M IPTG. Five ml of BHI broth containing 10 μ g/ml tetracycline was inoculated with a single colony and genomic DNA was extracted (Wizard DNA extraction kit, Promega). Genomic DNA was sequenced by paired-end joining Illumina (Biomics Platform of the Institut Pasteur, Paris, France).

Identification of the mutations was performed with the *breseq* pipeline (Deatherage & Barrick, 2014).

Plating efficiency assay

Bacteria were grown to the late exponential phase, i.e., to an optical density at 600 nm (OD_{600}) greater than 1.0 (ca. 6 h at 37°C under agitation). The OD_{600} was adjusted to 1.0- and 10-fold dilutions (10^{-1} to 10^{-6}) were prepared in BHI broth. Ten μ l of the resulting bacterial suspensions was spotted on BHI agar supplemented with inducers and drugs as indicated in the legend to figures. For the disk diffusion assay, 5 μ l of the bacterial suspension adjusted to an OD_{600} of 1.0 was inoculated in 5 ml of water. BHI agar plates were flooded with the latter suspension, excess liquid was removed, and the plates were kept at room temperature for 15 min prior to the addition of paper disks containing antibiotics or inducers. Plates were imaged after 16 h (or 24 h for plates containing ceftriaxone) of incubation at 37°C.

Detection of the production of PBP4 and AmpH with a fluorescent penicillin

Derivatives of BW25113(*ycbB*, *relA'*) Δ *mepM* harboring plasmids pHV48(*dacB*) or pHV50(*ampH*) were grown in the presence of L-rhamnose (0, 0.01, 0.1, and 1%), 10 μ g/ml tetracycline, 20 μ g/ml chloramphenicol, and 25 μ g/ml zeocin to the early stationary phase ($OD_{600} = 3.0$). The antibiotics were used to counter-select loss of plasmids pKT2, pKT8, and pHV48 or pHV50, respectively. Bacteria (1.5 ml) were washed in PBS, concentrated 10-fold (150 μ l), and incubated with 200 μ M BOCILLIN® FL Penicillin (Invitrogen) for 10 min at 20°C. Bacteria were washed with PBS, resuspended in 100 μ l of PBS, and 100 μ l of 2 \times Laemmli loading buffer was added. The mixture was incubated at 92°C for 3 min, and 30 μ l was analyzed by 12% SDS-PAGE. Images were acquired using the IBright FL 1500 (Thermo Fisher) imager in the protein fluorescence mode.

Purification of endopeptidases

The *mepM* gene was amplified by PCR and cloned into pET-TEV between the NdeI and XhoI restriction sites. The fusion protein comprised a 6 \times histidine tag, a TEV protease cleavage site, and residues 41–440 of MepM. The *mepH* and *mepS* genes were independently amplified by PCR and cloned in frame with *dsbC* into pETMM82 using NEBuilder HiFi DNA assembly (New England Biolabs). The fusion proteins comprised the DsbC chaperone (Firczuk & Bochtler, 2007), a 6 \times histidine tag, a TEV protease cleavage site, and residues 28–271 of MepH or 25–188 of MepS. The enzymes were produced in *E. coli* BL21(DE3) following induction by 0.5 mM IPTG for 18 h at 16°C. The endopeptidases were purified in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 from a clarified lysate by nickel affinity chromatography (elution with 0.5 mM imidazole). The endopeptidases were dialyzed overnight at 4°C against 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA. N-terminal tags were cleaved overnight at room temperature following addition of 10 μ g of TEV protease for every mg of protein and DTT at a final concentration of 0.5 mM. MepM, MepH, and MepS were further purified by size-exclusion chromatography (Superdex 75 HiLoad 26/60, GE Healthcare) in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl.

PBP4 was purified from strain BL21(DE3) pET21b Ω PBP4 Δ 1-60 as previously reported (Banzhaf *et al*, 2020). Briefly, cells were grown in the presence of 1 mM IPTG for 8 h at 20°C and then harvested by centrifugation at 7,500 \times g, 4°C, 15 min. Cell pellets were resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl and lysed by sonication. Following centrifugation at 14,000 \times g, 1 h, 4°C, the NaCl concentration was reduced by stepwise dialysis in a Spectra/Por dialysis membrane (MWCO 12–14 kDa) against 50 mM Tris-HCl pH 8.5 containing (i) 200 mM NaCl, (ii) 100 mM NaCl, and (iii) 30 mM NaCl. The sample was centrifuged at 7,500 \times g, 4°C, 10 min, and the supernatant was applied to a 5 ml HiTrap Q HP IEX column in 25 mM Tris-HCl pH 8.5, 30 mM NaCl. Protein was eluted from the column with a linear gradient from 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 100 mM NaCl, to 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl, over a 100 ml volume. Fractions containing PBP4 were combined and dialyzed against 10 mM potassium phosphate pH 6.8, 300 mM NaCl. Protein was applied at 1 ml/min to a 5 ml ceramic hydroxyapatite column (Bio-Rad BioscaleTM) in the dialysis buffer, and a 50 ml linear gradient to 500 mM potassium phosphate pH 6.8, 300 mM NaCl was applied. Fractions with PBP4 were dialyzed overnight against 25 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% glycerol, and concentrated to *ca.* 5 ml using a Vivaspin concentrator spin column (Sartorius). The protein sample was applied to a HiLoad 16/600 Superdex 200 column (GE healthcare) at 1 ml/min and eluted in a linear gradient to 25 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% glycerol. The collected fractions containing PBP4 were combined.

PBP7 was purified from strain BL21(DE3) pET28a Ω pbpG Δ 1-75 as previously reported (Banzhaf *et al*, 2020). Briefly, cells were grown in the presence of 1 mM IPTG for 3 h at 30°C before being harvested by centrifugation and resuspended in 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole. Following sonication and subsequent centrifugation, the lysate was applied to a 5 ml HisTrap HP column (GE healthcare) and washed with 4 column volumes of 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole. Bound protein was eluted with 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 400 mM Imidazole. Elution fractions containing PBP7 were combined and dialyzed overnight against 25 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% glycerol, in the presence of 1 unit/ml of restriction grade thrombin (Novagen) to remove the oligohistidine tag. The sample was then concentrated to *ca.* 5 ml using a Vivaspin concentrator spin column (Sartorius) at 4,500 \times g, 4°C. The protein sample was applied to a HiLoad 16/600 Superdex 200 column (GE healthcare) at 1 ml/min and eluted in 25 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% glycerol. Elution fractions containing PBP7 were combined.

Protein concentrations were determined by the Bio-Rad protein assay using bovine serum albumin as a standard. Endopeptidases were stored at –80°C.

Preparation of sacculi

Bacteria were grown in M9 minimal medium supplemented with 0.1% glucose at 37°C for 48 h. Bacteria were harvested by centrifugation and boiled in 4% sodium dodecyl sulfate (SDS) for 1 h. Sacculi were harvested by centrifugation (20,000 \times g for 20 min at 20°C), washed five times with water, and incubated with 100 μ g/ml pronase overnight at 37°C in 20 mM Tris-HCl pH 7.5. Sacculi were washed five times with water and incubated overnight at 37°C with 100 μ g/ml trypsin in 20 mM sodium phosphate pH 8.0. Sacculi

were washed five times with water, boiled for 5 min, collected by centrifugation, resuspended in water, and stored at –20°C.

Digestion of sacculi

Sacculi were digested overnight at 37°C with 120 μ M lysozyme alone or in association with an endopeptidase in 40 mM Tris-HCl pH 8.0. Insoluble material was removed by centrifugation, and the soluble fraction containing mucopeptides was reduced with sodium borohydride for 1 h in 125 mM borate buffer pH 9.0. The pH of the solution containing the reduced mucopeptides was adjusted to 4.0 with phosphoric acid. Mucopeptides were separated by *rp*HPLC in a C18 column (Hypersil GOLD aQ; 250 \times 4.6 mm; 3 μ m, Thermo Scientific) at a flow rate of 1 ml/min with a linear gradient (0–20%) applied between 10 and 60 min (buffer A, TFA 0.1%; buffer B, acetonitrile 20% TFA 0.1%). Absorbance was monitored at 205 nm and fractions were collected, lyophilized, and analyzed by mass spectrometry. Mass spectra were obtained on a Bruker Daltonics maXis high-resolution mass spectrometer (Bremen, Germany) operating in the positive mode (Analytical Platform of the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France). Theoretical masses were predicted using massXpert, and mass spectral data were explored using mineXpert2 (Rusconi, 2009; Langella & Rusconi, 2021).

Data availability

Whole genome sequencing raw data of *sltY* mutants (M1.1 to M1.4) are available at the Sequence Read Archive database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/study/?acc=PRJNA748867>).

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Research Agency ANR “RegO-Peps” (grant ANR-19-CE44-0007 to JEH). HV is the recipient of a doctoral fellowship from Sorbonne-Université (ED 515, complexité du vivant). We thank L. Dubost and A. Marie for technical assistance in the collection of mass spectra at the Bio-organic Mass Spectrometry Platform. We also thank L. Ma and R. Legendre for technical assistance in genome sequencing. The Biomics Platform is a member of the “France Génomique” consortium supported by the French National Research Agency ANR (grant ANR-10-INBS-0009) and IBISA. We also thank Z. Edoou for proofreading the manuscript.

Author contributions

HV: conception and design, acquisition, analysis, and interpretation of data, drafting, and revising the article. DD and AL: acquisition of data. WV: interpretation of data, drafting and revising the article. MA and JEH: conception and design, analysis and interpretation of data, drafting and revising the article.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12

- in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2: 2006.0008
- Banzhaf M, Yau HC, Verheul J, Lodge A, Kritikos G, Mateus A, Cordier B, Hov AK, Stein F, Wartel M *et al* (2020) Outer membrane lipoprotein Nlpl scaffolds peptidoglycan hydrolases within multi-enzyme complexes in *Escherichia coli*. *EMBO J* 39: e102246
- Baranowski C, Welsh MA, Sham L-T, Eskandarian HA, Lim HC, Kieser KJ, Wagner JC, McKinney JD, Fantner GE, Ioerger TR *et al* (2018) Maturing *Mycobacterium smegmatis* peptidoglycan requires non-canonical crosslinks to maintain shape. *Elife* 7: e37516
- Bastos PAD, Wheeler R, Boneca IG (2021) Uptake, recognition and responses to peptidoglycan in the mammalian host. *FEMS Microbiol Rev* 45: fuaa044
- Bonis M, Ecobichon C, Guadagnini S, Prévost MC, Boneca IG (2010) A M23B family metallopeptidase of *Helicobacter pylori* required for cell shape, pole formation and virulence. *Mol Microbiol* 78: 809–819
- Caveney NA, Caballero G, Voedts H, Niciforovic A, Worrall LJ, Vuckovic M, Fonvielle M, Hugonnet J-E, Arthur M, Strynadka NCJ (2019) Structural insight into YcbB-mediated beta-lactam resistance in *Escherichia coli*. *Nat Commun* 10: 1849
- Cho H, Uehara T, Bernhardt TG (2014) Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell* 159: 1300–1311
- Chodiseti PK, Reddy M (2019) Peptidoglycan hydrolase of an unusual cross-link cleavage specificity contributes to bacterial cell wall synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 116: 7825–7830
- Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6640–6645
- De Jonge BLM, Wientjes FB, Jurida I, Driehuis F, Wouters JTM, Nanninga N (1989) Peptidoglycan synthesis during the cell cycle of *Escherichia coli*: composition and mode of insertion. *J Bacteriol* 171: 5783–5794
- Deathage DE, Barrick JE (2014) Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. *Methods Mol Biol* 1151: 165–188
- Delhay A, Collet JF, Laloux G (2016) Fine-tuning of the Cpx envelope stress response is required for cell wall homeostasis in *Escherichia coli*. *MBio* 7: 47–63
- Denome SA, Elf PK, Henderson TA, Nelson DE, Young KD (1999) *Escherichia coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis. *J Bacteriol* 181: 3981–3993
- Elowitz MB, Leibler S (2000) A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* 403: 335–338
- Engel H, van Leeuwen AM, Dijkstra A, Keck W (1992) Enzymatic preparation of 1,6-anhydro-muropeptides by immobilized murein hydrolases from *Escherichia coli* fused to staphylococcal protein A. *Appl Microbiol Biotechnol* 37: 772–783
- Firczuk M, Bochtler M (2007) Mutational analysis of peptidoglycan amidase MepA. *Biochemistry* 46: 120–128
- Glauner B, Höltje JV, Schwarz U (1988) The composition of the murein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 263: 10088–10095
- Gonzalez-Leiza SM, de Pedro MA, Ayala JA (2011) AmpH, a bifunctional DD-endopeptidase and DD-carboxypeptidase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 193: 6887–6894
- Healy C, Gouzy A, Ehrt S (2020) Peptidoglycan hydrolases RipA and Ami1 are critical for replication and persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in the host. *MBio* 11: e03315
- Hecht A, Glasgow J, Jaschke PR, Bawazer LA, Munson MS, Cochran JR, Endy D, Salit M (2017) Measurements of translation initiation from all 64 codons in *E. coli*. *Nucleic Acids Res* 45: 3615–3626
- Heidrich C, Ursinus A, Berger J, Schwarz H, Höltje JV (2002) Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184: 6093–6099
- van Heijenoort J (2011) Peptidoglycan Hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 636–663
- Henderson TA, Young KD, Denome SA, Elf PK (1997) AmpC and AmpH, proteins related to the class C beta-lactamases, bind penicillin and contribute to the normal morphology of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179: 6112–6121
- Höltje JV, Heidrich C (2001) Enzymology of elongation and constriction of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Biochimie* 83: 103–108
- Hugonnet JE, Mengin-Lecreux D, Monton A, den Blaauwen T, Carbonnelle E, Veckerlé C, Yves VB, van Nieuwenhze M, Bouchier C, Tu K *et al* (2016) Factors essential for L, D-transpeptidase-mediated peptidoglycan cross-linking and beta-lactam resistance in *Escherichia coli*. *Elife* 5: e19469
- Johnson JW, Fisher JF, Mobashery S (2013) Bacterial cell-wall recycling. *Ann N Y Acad Sci* 1277: 54–75
- Keck W, Schwarz U (1979) *Escherichia coli* murein-DD-endopeptidase insensitive to beta-lactam antibiotics. *J Bacteriol* 139: 770–774
- Kocaoglu O, Carlson EE (2015) Profiling of beta-lactam selectivity for penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* strain DC2. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 2785–2790
- Korat B, Mottl H, Keck W (1991) Penicillin-binding protein 4 of *Escherichia coli*: molecular cloning of the dacB gene, controlled overexpression, and alterations in murein composition. *Mol Microbiol* 5: 675–684
- Lai GC, Cho H, Bernhardt TG (2017) The mecillinam resistome reveals a role for peptidoglycan endopeptidases in stimulating cell wall synthesis in *Escherichia coli*. *PLOS Genet* 13: e1006934
- Langella O, Rusconi F (2021) mineXpert2: full-depth visualization and exploration of MSnMass spectrometry data. *J Am Soc Mass Spectrom* 32: 1138–1141
- Lenz JD, Hackett KT, Dillard JP (2017) A single dual-function enzyme controls the production of inflammatory NOD agonist peptidoglycan fragments by neisseria gonorrhoeae. *MBio* 8: e01464-17
- Magnet S, Dubost L, Marie A, Arthur M, Gutmann L (2008) Identification of the L, D-transpeptidases for peptidoglycan cross-linking in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190: 4782–4785
- Mainardi JL, Fourgeaud M, Hugonnet JE, Dubost L, Brouard JP, Ouazzani J, Rice LB, Gutmann L, Arthur M (2005) A novel peptidoglycan cross-linking enzyme for a beta-lactam-resistant transpeptidation pathway. *J Biol Chem* 280: 38146–38152
- Mainardi JL, Villet R, Bugg TD, Mayer C, Arthur M (2008) Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 32: 386–408
- Morè N, Martorana AM, Biboy J, Otten C, Winkle M, Serrano CKG, Montón Silva A, Atkinson L, Yau H, Breukink E *et al* (2019) Peptidoglycan remodeling enables *Escherichia coli* to survive severe outer membrane assembly defect. *MBio* 10: e02729-18
- Pazos M, Peters K, Vollmer W (2017) Robust peptidoglycan growth by dynamic and variable multi-protein complexes. *Curr Opin Microbiol* 36: 55–61
- Pazos M, Peters K (2019) *Peptidoglycan subcellular biochemistry*. New York: Springer; 127–168
- Pisabarro AG, De Pedro MA, Vazquez D (1985) Structural modifications in the peptidoglycan of *Escherichia coli* associated with changes in the state of growth of the culture. *J Bacteriol* 161: 238–242

- Ringquist S, Shinedling S, Barrick D, Green L, Binkley J, Stormo GD, Gold L (1992) Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. *Mol Microbiol* 6: 1219–1229
- Romeis T, Holtje J-V (1994) Penicillin-binding protein 7/8 of *Escherichia coli* is a dd-endopeptidase. *Eur J Biochem* 224: 597–604
- Rusconi F (2009) massXpert 2: A cross-platform software environment for polymer chemistry modelling and simulation/analysis of mass spectrometric data. *Bioinformatics* 25: 2741–2742
- Sanders AN, Pavelka MS (2013) Phenotypic analysis of *Escherichia coli* mutants lacking l, d-transpeptidases. *Microbiology* 159: 1842–1852
- Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P (2008) The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32: 234–258
- Schreiber G, Metzger S, Aizenman E, Roza S, Cashel M, Glaser G (1991) Overexpression of the *relA* gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 266: 3760–3767
- Singh SK, Parveen S, SaiSree L, Reddy M (2015) Regulated proteolysis of a cross-link-specific peptidoglycan hydrolase contributes to bacterial morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 10956–10961
- Singh SK, SaiSree L, Amrutha RN, Reddy M (2012) Three redundant murein endopeptidases catalyse an essential cleavage step in peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol* 86: 1036–1051
- Truong TT, Vettiger A, Bernhardt TG (2020) Cell division is antagonized by the activity of peptidoglycan endopeptidases that promote cell elongation. *Mol Microbiol* 114: 966–978
- Turner RD, Vollmer W, Foster SJ (2014) Different walls for rods and balls: the diversity of peptidoglycan. *Mol Microbiol* 91: 862–874
- Uehara T, Dinh T, Bernhardt TG (2009) LytM-domain factors are required for daughter cell separation and rapid ampicillin-induced lysis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 191: 5094–5107
- Uehara T, Park JT (2008) Growth of *Escherichia coli*: significance of peptidoglycan degradation during elongation and septation. *J Bacteriol* 190: 3914–3922
- Vellanoweth RL, Rabinowitz JC (1992) The influence of ribosome-binding-site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* *in vivo*. *Mol Microbiol* 6: 1105–1114
- Verheul J, Lodge A, Yau HC, Liu X, Typas A, Banzhaf M, Vollmer W & Den T (2020) Midcell localization of PBP4 of *Escherichia coli* is essential for the timing of divisome assembly. bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.07.30.230052> [PREPRINT]
- Vollmer W (2012) Bacterial growth does require peptidoglycan hydrolases. *Mol Microbiol* 86: 1031–1035
- Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF, Hengge R (2005) Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ^S -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* 187: 1591–1603

Expanded View Figures

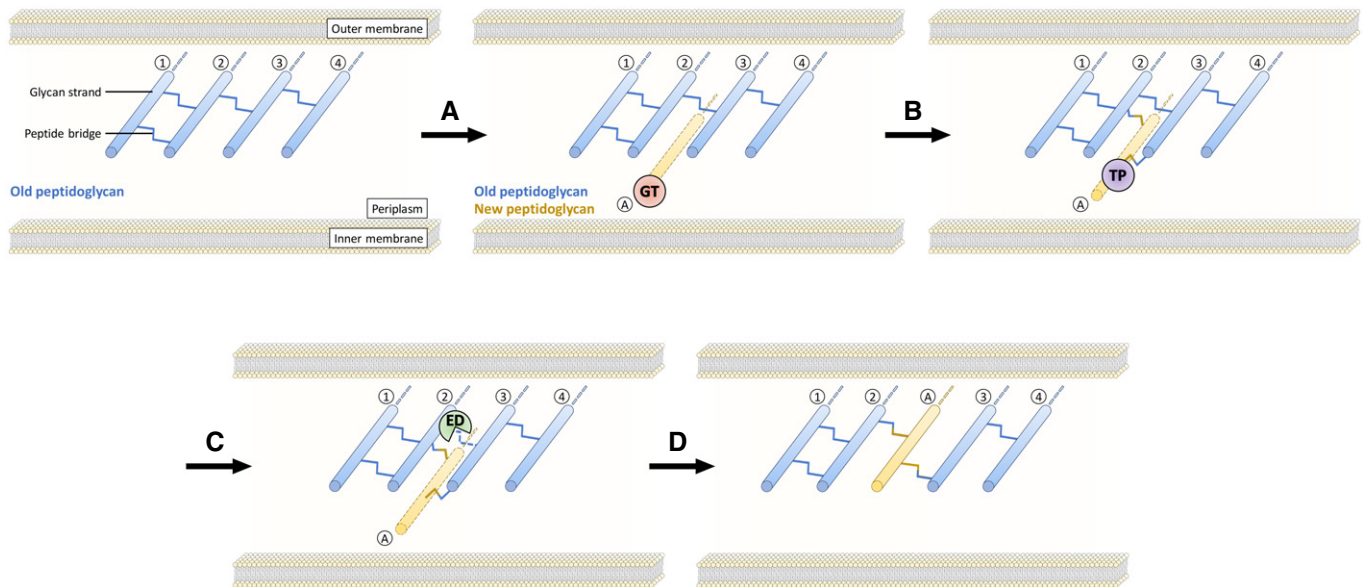


Figure EV1. Insertion of PG subunits into the growing PG network.

According to this model, one glycan strand (circled A) is polymerized by glycosyltransferases (GTs; step A) and attached to the pre-existing polymer (strands 2 and 3) by transpeptidases (TPs; step B). Hydrolysis of the cross-links connecting strands 2 and 3 by endopeptidases (EDs; step C) results in the expansion of the PG layer (step D). Of note, this model, which applies to the synthesis of the lateral wall, accounts for incorporation of new subunits sheltered from the cytoplasm osmotic pressure (De Jonge *et al.*, 1989). There are other models in which whole glycan strands are removed (Höltje & Heidrich, 2001). All models predict that amide bonds should be cleaved for extension of the peptidoglycan network.

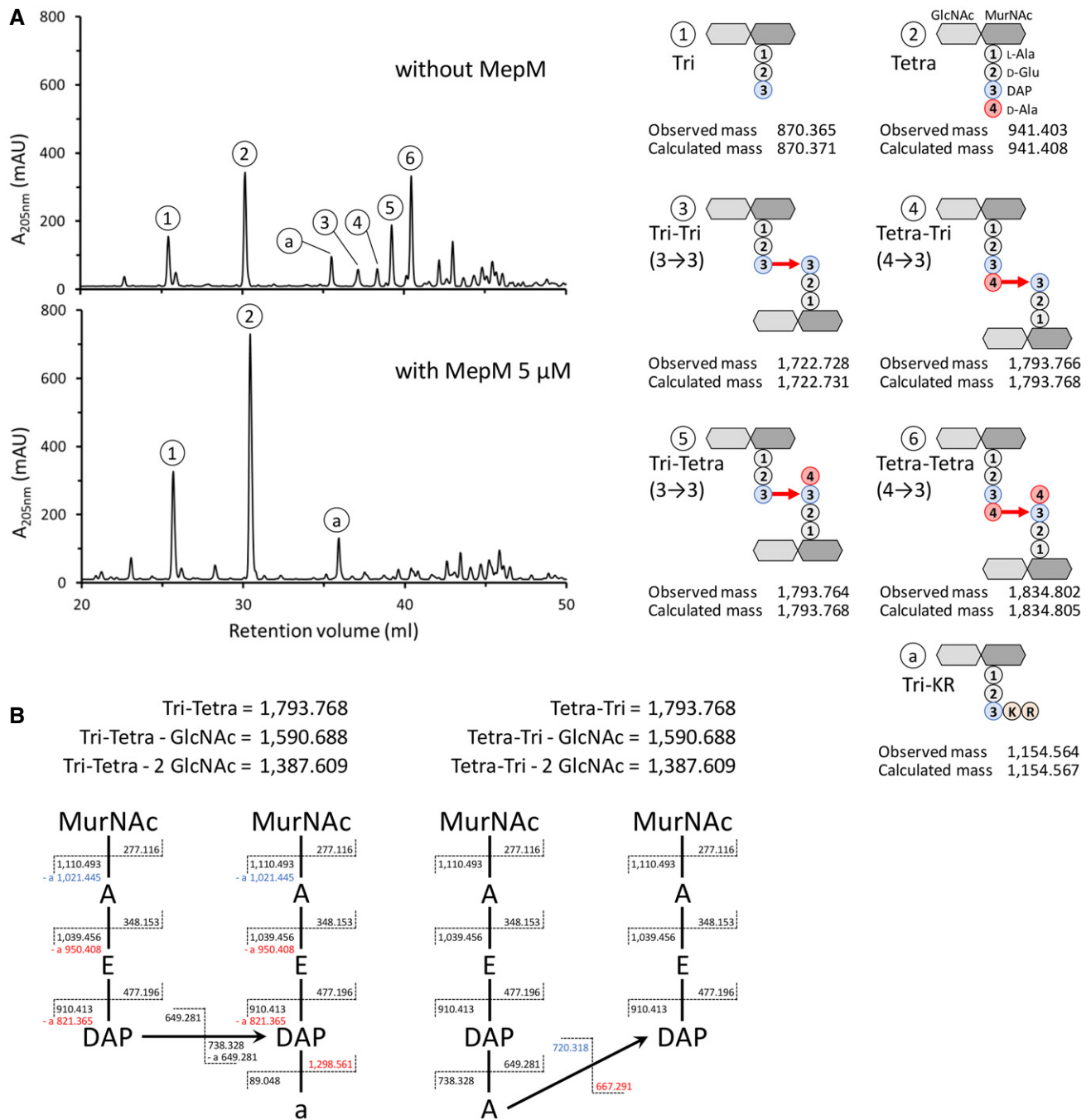


Figure EV2. Analysis of endopeptidases activity by mass spectrometry.

- A** Mass spectrometry analysis of mucopeptides obtained by digestion of sacculi from BW25113 with lysozyme (upper panel) or lysozyme plus MepM (lower panel). The observed and calculated monoisotopic mass is indicated in Dalton. Peak a corresponds to a disaccharide-tripeptide substituted by a Lys-Arg (KR) dipeptide originating from digestion of the covalently-bond Braun lipoprotein by trypsin (Magnet *et al.*, 2008).
- B** Discrimination of isomers containing 3→3 (Tri-Tetra) and 4→3 (Tetra-Tri) cross-links by tandem mass spectrometry. All fragments lost both GlcNAc molecules. Fragments that are specific of each isomer are shown in red. Fragments specific of an isomer but which can also be found in the other isomer following loss of a water molecule are shown in blue. Mass of fragments is shown in Dalton. A, L-Ala or D-Ala; a, C-terminal D-Ala; E, D-Glu; DAP, diaminopimelic acid.

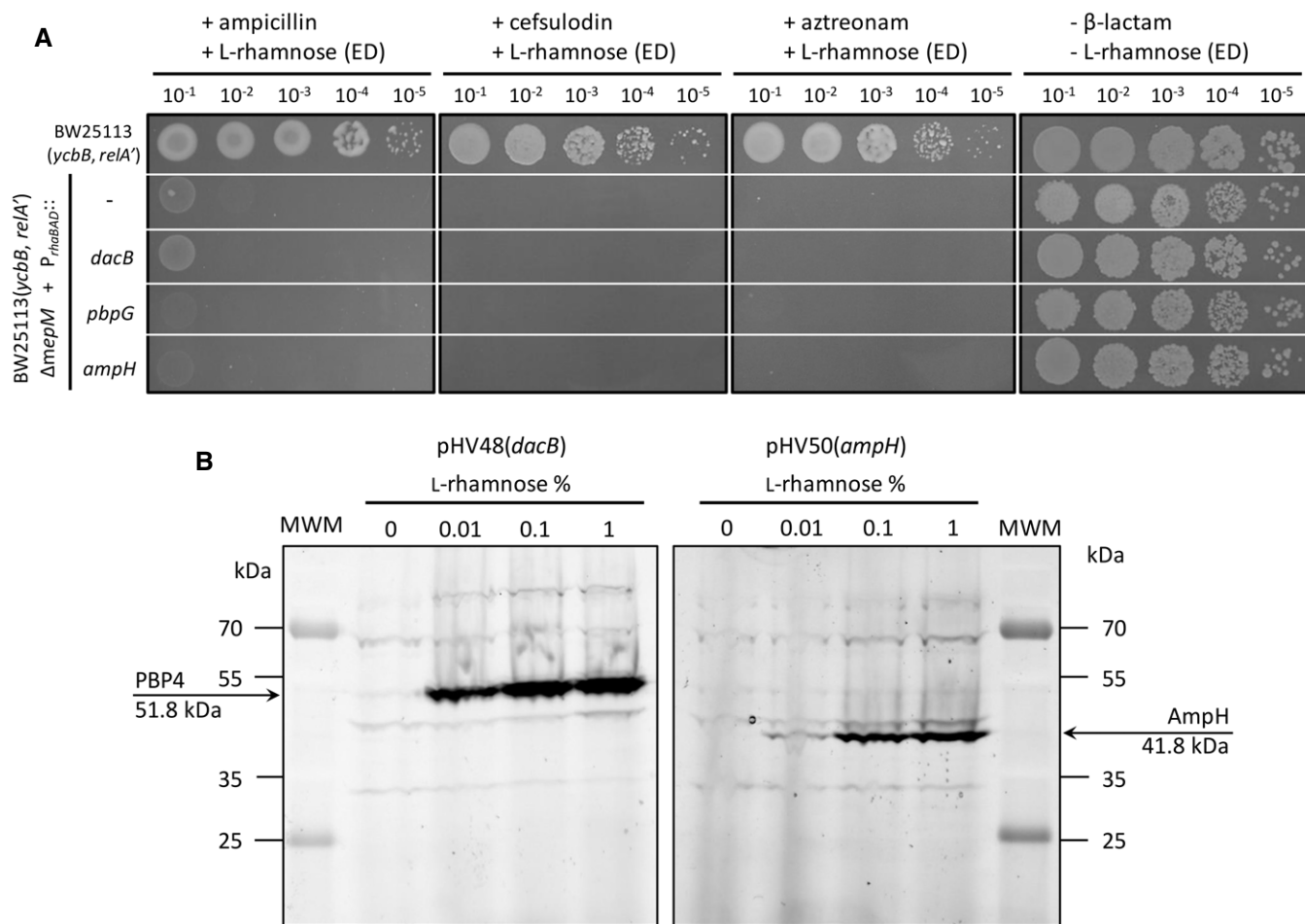


Figure EV3. Complementation of the *mepM* deletion by endopeptidases of the PBP family.

A Functional complementation of the *mepM* deletion of BW25113(*ycbB, relA'*) $\Delta mepM$ was performed with the pHV30 vector or recombinant plasmids encoding PBP4, PBP7, and AmpH under the control of the *P_{rhaBAD}* promoter. Induction of endopeptidase (ED) genes was performed with 0.2% L-rhamnose in the presence or absence of 16 μ g/ml ampicillin, 32 μ g/ml cefsulodin, or 8 μ g/ml aztreonam. BHI agar plates contained 40 μ M IPTG and 1% L-arabinose for induction *ycbB* and *relA'*, respectively. It was previously shown that ampicillin, cefsulodin, and aztreonam do not inhibit peptidoglycan cross-linking in BW25113(*ycbB, relA'*) due to full bypass of the D,D-transpeptidase activity of PBPs by the L,D-transpeptidase activity of YcbB, which is not inactivated by these drugs (Hugonnet *et al.*, 2016).

B Control experiment showing that the *P_{rhaBAD}* promoter in plasmids pHV48(*dacB*) and pHV50(*ampH*) enables inducible production PBP4 and AmpH. PBPs were labeled with a fluorescent β -lactam (BOCILLIN® FL Penicillin) in intact cells and separated by SDS-PAGE. This control experiment was only performed for PBP4 and AmpH since modifications of the resistance or growth phenotypes were observed for the induction of all other endopeptidase genes in at least one of the assays reported in the entire study. MWM, molecular weight marker.

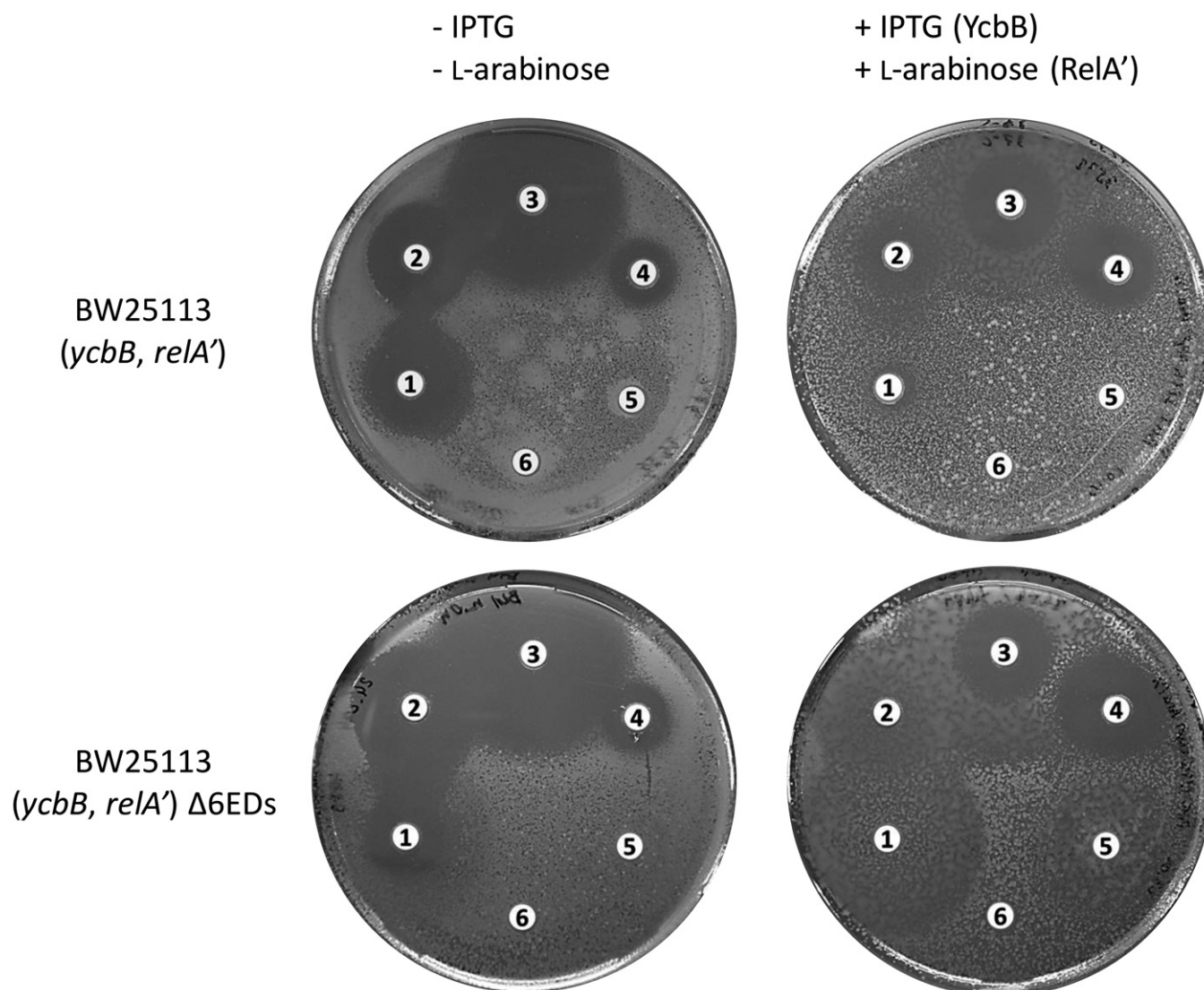


Figure EV4. Antibiotic susceptibility testing by the disk diffusion assay.

Disks contained 10 μ g mecillinam (1), 10 μ g ampicillin (2), 30 μ g ceftriaxone (3), 30 μ g tetracycline (4), 30 μ g chloramphenicol (5), and 30 μ g kanamycin (6). Plasmids pKT2 (*ycbB*) and pKT8(*relA'*) confer resistance to tetracycline and chloramphenicol, respectively. Kanamycin resistance is mediated by the Km^R cassette inserted in place of *relA*. Induction of *ycbB* and *relA'* was performed with 40 μ M IPTG and 1% L-arabinose.

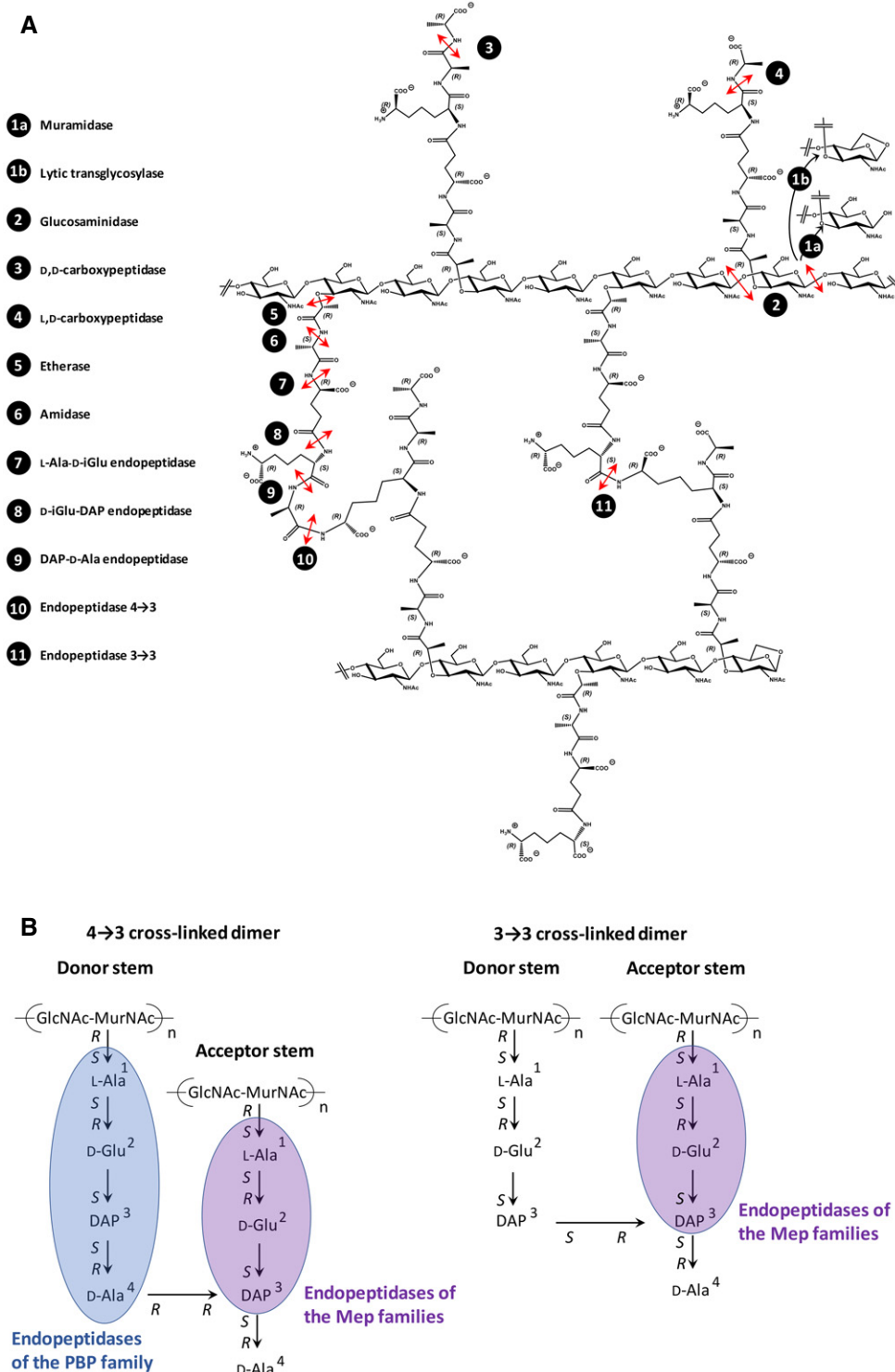


Figure EV5. Specificity of PG hydrolases.

A Highlight of enzyme stereospecificity. The commonly used endopeptidase designation was employed in the entire manuscript to refer to the cleavage of internal bonds although certain enzymes do not cleave peptide bonds connecting the α amino and carboxyl groups of two consecutive amino acids and should have been more precisely referred to as amidases.

B Recognition of the donor and acceptor stems of dimers by PBP and Mep endopeptidases accounting for the 4→3 versus 4→3 plus 3→3 specificities. According to this model, endopeptidases of the Mep families cleave both 4→3 plus 3→3 cross-links since they interact with the tripeptide portion of the acceptor stem, which is present in both types of dimers. In contrast, endopeptidases of the PBP family specifically interact with the tetrapeptide donor stem of 4→3 cross-linked dimers.

APPENDIX

Role of endopeptidases in peptidoglycan synthesis mediated by alternative cross-linking enzymes in *Escherichia coli*

Henri Voedts^a, Delphine Dorchêne^a, Adam Lodge^{b#}, Waldemar Vollmer^b, Michel Arthur^{a+*}, Jean-Emmanuel Hugonnet^{a+*}

^a Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, Inserm, Université de Paris, F-75006 Paris, France; ^b Centre for Bacterial Cell Biology, Biosciences Institute, Newcastle University, Newcastle Upon Tyne, UK; [#] Present address: Iksuda Therapeutics, The Biosphere, Draymans Way, Newcastle Helix, Newcastle upon Tyne, NE4 5BX, UK.

+ Equal contributions

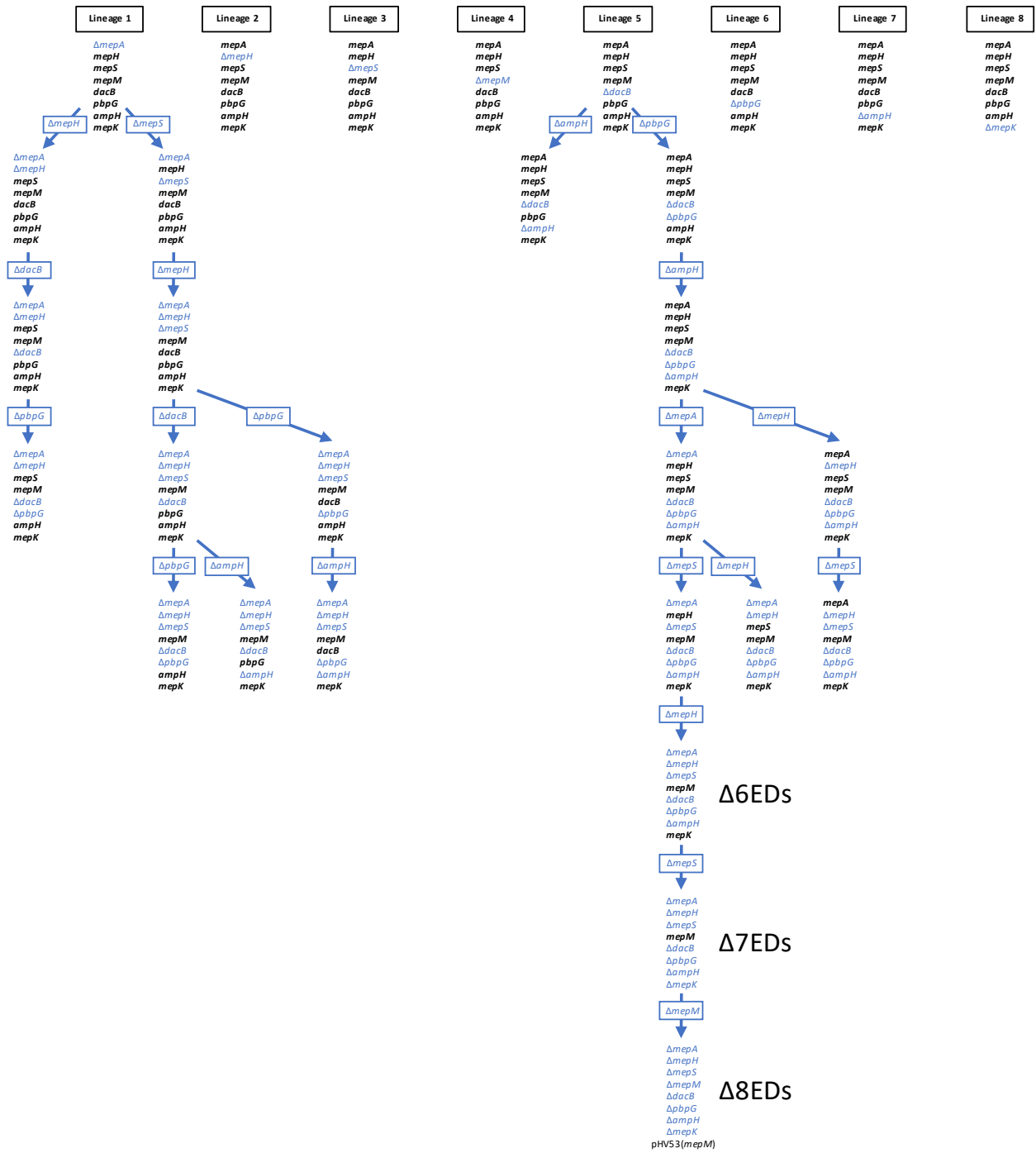
* Corresponding authors, michel.arthur@crc.jussieu.fr; jean-emmanuel.hugonnet@crc.jussieu.fr

TABLE OF CONTENT

Appendix Figure S1. Parallel and serial deletion of endopeptidase genes in *E. coli* BW25113 $\Delta relA$.

Table S1. Characteristics and origin of the plasmids used in this study

Table S2. Characteristics and origin of *E. coli* strains used in this study



Appendix Figure S1. Parallel and serial deletion of endopeptidase genes in *E. coli* BW25113 $\Delta relA$. Deletions indicated in blue were introduced by the procedure of Datsenko and Wanner (Datsenko & Wanner, 2000). The remaining endopeptidase genes are indicated in black. The presence of all deletions was verified by PCR at each steps. The genomes of the strains retaining *mepM* and *mepK* ($\Delta 6EDs$) or only *mepM* ($\Delta 7EDs$) were re-sequenced and no compensatory mutation was detected.

Table S1. Characteristics and origin of the plasmids used in this study

Plasmid	Characteristics	Origin
<i>Vectors</i>		
pHV6	Tet ^R P _{trc} <i>lacI</i> <i>oriV</i> CloDF13	This study
pHV7	Cm ^R P _{araBAD} <i>araC</i> <i>oriV</i> P15a	This study
pHV9	Zeo ^R P _{phIF} <i>phIF</i> <i>oriV</i> pBR322	This study
pHV30	Zeo ^R P _{rhaBAD} TIS1 <i>rhaSR</i> <i>oriV</i> pSC101	This study
pET-TEV	Km ^R P _{T7} <i>lacI</i> <i>oriV</i> ColE1	(Houben et al., 2007)
pETMM82	Km ^R P _{T7} <i>dsbC</i> <i>lacI</i> <i>oriV</i> ColE1	(Firczuk & Bochtler, 2007)
<i>Recombinant plasmids for ycbB and relA' expression</i>		
pKT2	pHV6Ω <i>ycbB</i>	(Hugonnet et al., 2016)
pKT8	pHV7Ω <i>relA'</i>	(Hugonnet et al., 2016)
pHV63	pHV7Ω <i>ycbB</i>	This study
<i>Recombinant plasmids for complementation of endopeptidase gene deletions</i>		
pHV10.1	pHV9Ω <i>mepM</i>	This study
pHV10.2	pHV9Ω <i>mepM</i> H ^{393A}	This study
pHV10.3	pHV9Ω <i>mepM</i> Δ936-1224 (ΔLytM domain)	This study
pHV43.1	pHV30Ω <i>mepA</i>	This study
pHV43.2	pHV30Ω <i>mepA</i> H ^{113A}	This study
pHV44	pHV30Ω <i>mepH</i>	This study
pHV45.1	pHV30Ω <i>mepK</i>	This study
pHV45.2	pHV30Ω <i>mepK</i> H ^{133A}	This study
pHV46	pHV30Ω <i>mepM</i>	This study
pHV47.1	pHV30Ω <i>mepS</i>	This study
pHV47.2	pHV30Ω <i>mepS</i> C ^{94A}	This study
pHV48	pHV30Ω <i>dacB</i>	This study
pHV49	pHV30Ω <i>pbpG</i>	This study
pHV50	pHV30Ω <i>ampH</i>	This study
pHV53	pHV30ΩTIS2- <i>mepM</i>	This study
pHV55	pHV7Ω <i>mepA</i>	This study
pHV56	pHV7Ω <i>mepH</i>	This study
pHV57	pHV7Ω <i>mepK</i>	This study
pHV58	pHV7Ω <i>mepM</i>	This study
pHV59	pHV7Ω <i>mepS</i>	This study
pHV60	pHV7Ω <i>dacB</i>	This study
pHV61	pHV7Ω <i>pbpG</i>	This study
pHV62	pHV7Ω <i>ampH</i>	This study
<i>Recombinant plasmids for protein production</i>		
pET-TEVΩ <i>mepM</i> Δ1-120	Production of MepM Δ1-40	This study
pETMM82Ω <i>mepH</i> Δ1-81	Production of MepH Δ1-27	This study
pETMM82Ω <i>mepS</i> Δ1-72	Production of MepS Δ1-24	This study
pET21bΩ <i>dacB</i> Δ1-60	Production of PBP4 Δ1-20	(Banzhaf et al., 2020)
pET28aΩ <i>pbpG</i> Δ1-75	Production of PBP7 Δ1-25	(Banzhaf et al., 2020)

Table S2. Characteristics and origin of *E. coli* strains used in this study

Strain	Characteristics	Origin
BW25113	$\Delta(araD-araB)567 \Delta(rhaD-rhaB)568$ $\Delta lacZ4787 (::rrnB-3) hsdR514 rph-1$	(Baba et al., 2006)
BW25113(<i>ycbB</i> , <i>relA'</i>)	$\Delta relA$ derivative of BW25113 harboring pKT2(<i>ycbB</i>) and pKT8(<i>relA'</i>)	(Hugonnet et al., 2016)
BW25113 M1	Ampicillin resistant derivative of BW25113 pJEH12(<i>ycbB</i>) harboring a mutation in the 5' UTR region of <i>ileRS</i>	(Hugonnet et al., 2016)
BL21(DE3)	Host for protein production	(Wood, 1966)

REFERENCES

- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Banzhaf, M., Yau, H. C., Verheul, J., Lodge, A., Kritikos, G., Mateus, A., Cordier, B., Hov, A. K., Stein, F., Wartel, M., Pazos, M., Solovyova, A. S., Breukink, E., van Teeffelen, S., Savitski, M. M., den Blaauwen, T., Typas, A., & Vollmer, W. (2020). Outer membrane lipoprotein NlpI scaffolds peptidoglycan hydrolases within multi-enzyme complexes in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 39(5). <https://doi.org/10.15252/embj.2019102246>
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
- Firczuk, M., & Bochtler, M. (2007). Mutational analysis of peptidoglycan amidase MepA. *Biochemistry*, 46(1), 120–128. <https://doi.org/10.1021/bi0613776>
- Houben, K., Marion, D., Tarbouriech, N., Ruigrok, R. W. H., & Blanchard, L. (2007). Interaction of the C-Terminal Domains of Sendai Virus N and P Proteins: Comparison of Polymerase-Nucleocapsid Interactions within the Paramyxovirus Family. *Journal of Virology*, 81(13), 6807–6816. <https://doi.org/10.1128/jvi.00338-07>
- Hugonnet, J. E., Mengin-Lecreulx, D., Monton, A., den Blaauwen, T., Carbonnelle, E., Veckerlé, C., Yves, V. B., van Nieuwenhze, M., Bouchier, C., Tu, K., Rice, L. B., & Arthur, M. (2016). Factors essential for L,D-transpeptidase-mediated peptidoglycan cross-linking and β -lactam resistance in *Escherichia coli*. *ELife*, 5(OCTOBER2016). <https://doi.org/10.7554/eLife.19469>
- Wood, W. B. (1966). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: Bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *Journal of Molecular Biology*, 16(1), 118–133. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(66\)80267-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(66)80267-X)

Conclusion

Le métabolisme des eucaryotes supérieurs fait intervenir principalement des ensembles complexes d'isozymes qui catalysent la même réaction dans des tissus et des stades de développement spécifiques. En revanche, les bactéries produisent généralement une seule enzyme par réaction. Ainsi, les étapes périplasmiques de la synthèse du peptidoglycane sont très atypiques car la plupart des réactions sont catalysées par de multiples enzymes. L'importance de cette redondance n'avait jusqu'à présent pas été considérée pour la synthèse d'un peptidoglycane réticulé par des ponts 4→3 ou 3→3 dans la même espèce bactérienne. Dans l'article 1, nous montrons que des modes distincts de réticulation du peptidoglycane sont rendus possibles par le recrutement de différentes combinaisons d'enzymes *a priori* similaires. La possibilité de contrôler le mode de réticulation (4→3 vs 3→3) ouvre de nouvelles voies pour explorer la fonction des protéines impliquées dans la polymérisation du peptidoglycane sur la base de l'analyse de phénotypes conditionnellement létaux (résistant vs sensible aux β-lactamines).

La vision générale actuelle est que la synthèse du peptidoglycane est généralement réalisée par deux complexes enzymatiques impliqués dans l'expansion de la paroi cellulaire latérale (élongasome) et dans la formation du septum (divisome) (Egan et al. 2020). Ces complexes comprennent différents ensembles d'enzymes spécialisées, de protéines du cytosquelette et de régulateurs, avec des fonctions partiellement redondantes. Un modèle plus récent propose que les complexes de polymérisation s'assemblent à partir d'un ensemble d'enzymes librement diffusibles pour réaliser l'expansion du peptidoglycane à différents stades du cycle cellulaires et dans différents environnements qui affectent par exemple l'osmolarité et le pH du périplasme (Pazos, Peters, and Vollmer 2017). Selon ce point de vue, l'attribution d'une protéine au divisome ou à l'élongasome n'implique pas que la protéine fonctionnera exclusivement dans ce complexe et n'exclut pas la possibilité que la protéine puisse fonctionner avec un nombre réduit de partenaires indépendamment d'un élongasome et divisome complet. Le remplacement de l'activité D,D-transpeptidase des PBP par l'activité L,D-transpeptidase de YcbB, ainsi que la remplacement de certaines endopeptidases par la surproduction d'autres endopeptidases sont des preuves directes de ce modèle plus récent de synthèse du peptidoglycane qui intègre la redondance des enzymes.

2. Identification des partenaires fonctionnels de YcbB

Introduction

L'approche gène candidat nous a permis d'identifier MepM et MepK comme nécessaires à la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB en plus de l'activité glycosyltransférase de la PBP1b et de l'activité D,D-carboxypeptidase de la PBP5 (Hugonnet et al. 2016). Nous avons ensuite cherché à identifier de manière exhaustive l'ensemble des gènes nécessaires à la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB ainsi qu'à comprendre la fonction des protéines correspondantes. De plus, chez *E. coli* la résistance aux β -lactamines provient généralement de la production de β -lactamases, de pompes à efflux ou de porines mutées (Blair et al. 2015). Dans ces trois cas de figures, la résistance provient du fait que les β -lactamines ne peuvent pas inhiber efficacement les PBP. Dans la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB, les β -lactamines sont toujours présentes dans le périplasme et inactivent efficacement leurs cibles. Cette particularité fait de ce mécanisme de résistance un formidable outil pour comprendre davantage les effets de l'inactivation des PBP dans des bactéries vivantes.

Le deuxième article a pour objectif l'identification de l'ensemble des partenaires de YcbB dans la synthèse du peptidoglycane et pour la résistance aux β -lactamines. Par comparaison des gènes requis pour la croissance en absence de β -lactamines (majorité de ponts 4 \rightarrow 3) et en présence de β -lactamines (majorité de ponts 3 \rightarrow 3) identifiés par une approche Tn-seq, nous établissons la liste de l'ensemble des gènes essentiels à la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB. La construction de mutants de l'élongasome par l'approche CRISPR-Cas9 nous a permis d'identifier la fonction de ce complexe lorsque YcbB est la seule transpeptidase fonctionnelle. La construction de mutants pour décortiquer les relations épistatiques, des analyses de composition du peptidoglycane, et l'étude de l'intégrité de l'enveloppe nous a également permis d'identifier l'impact des β -lactamines sur la perméabilité de la membrane externe.

Article 2

Genome-wide identification of genes required for alternative peptidoglycan cross-linking in *Escherichia coli* revealed an unexpected impact of β -lactams

Henri Voedts¹, Sean P. Kennedy², Guennadi Sezonov¹, Michel Arthur^{1#*}, and Jean-Emmanuel Hugonnet^{1#*}

¹ Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, Inserm, Université Paris Cité, F-75006 Paris, France.

² Institut Pasteur, Université Paris Cité, Département Biologie Computationnelle, F-75015 Paris, France.

Equal contributions

* Corresponding authors: michel.arthur@crc.jussieu.fr; jean-emmanuel.hugonnet@crc.jussieu.fr

The D,D-transpeptidase activity of penicillin-binding proteins (PBPs) is the well-known primary target of β -lactam antibiotics that block peptidoglycan polymerization. β -lactam-induced killing involves complex downstream responses whose causes and consequences are difficult to deconvolute. Here we show that bypass of PBPs by a β -lactam-insensitive L,D-transpeptidase provides a powerful tool for studying these responses in living bacteria. Tn-seq analysis identified 179 genes selectively essential to prevent the toxic effects of PBP inactivation by β -lactams. Integrity of peptidoglycan synthesis mediated by RodA in a functional elongasome was essential as well as many genes involved in the synthesis of outer membrane polymers. Growth in the presence of β -lactams prevented the anchoring of the Braun lipoprotein to peptidoglycan and weakened the permeability barrier of the outer membrane. These findings reveal unsuspected side effects of β -lactams and identify a critical role of the outer membrane for homeostasis of the cell envelope in the presence of β -lactams.

INTRODUCTION

Gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli*, possess a multilayer envelope that sustains the turgor pressure of the cytoplasm (cell wall peptidoglycan) and acts as a selective chemical barrier for nutrients, waste, and toxic compounds (inner and outer membranes) (Fig. 1A)¹.

Several polymers containing protein, peptide, glycan, and lipid moieties ensure the mechanical properties and the transport functions of the envelope. The peptidoglycan (PG), which is covalently linked to the outer membrane via the Braun lipoprotein, is a giant net-like macromolecule (*ca.* 10^9 Da) polymerized from a disaccharide-pentapeptide unit (Fig. 1B). Glycosyltransferases catalyze formation of β -1,4 glycosidic bonds between disaccharides to form glycan chains that are cross-linked to each other by transpeptidases (Fig. 1C). The latter enzymes, the D,D-transpeptidases, also referred to as penicillin-binding proteins (PBPs) as they are the essential targets of β -lactam antibiotics, cleave the D-Ala⁴-D-Ala⁵ peptide bond of pentapeptide stems (hence the D,D designation) and form 4 \rightarrow 3 cross-links (Fig. 1C; Supplementary Fig. S1A)². In cooperation with scaffolding proteins and endopeptidases, the D,D-transpeptidases mediate insertion of glycan strands into the expanding PG net-like macromolecule thereby determining bacterial shape and ensuring a mechanical barrier against the osmotic pressure of the cytoplasm during the entire cell cycle³⁻⁷.

By-pass of the D,D-transpeptidase activity of PBPs by unrelated L,D-transpeptidases results in resistance to most β -lactams⁸. The L,D-transpeptidases cleave the L,D *meso*DAP³-D-Ala⁴ peptide bond of tetrapeptide stems and form 3 \rightarrow 3 cross-links (Fig. 1C; Supplementary Fig. S1B)⁹. Other members of the L,D-transpeptidase family are responsible for the anchoring of the Braun lipoprotein to the PG (Supplementary Fig. S1C)¹⁰. Activation of the mostly cryptic L,D-transpeptidase PG polymerization pathway was first discovered in β -lactam-resistant mutants of *Enterococcus faecium* selected *in vitro*^{11,12}. L,D-transpeptidation is the main mode of PG cross-linking in pathogenic *Mycobacterium tuberculosis*¹³ and can be targeted by third-line chemotherapies based on the β -lactam meropenem¹⁴. In *E. coli*, activation of the pathway requires overproduction of both the YcbB L,D-transpeptidase (LdtD) and of the guanosine penta- or tetra-phosphate (p)ppGpp alarmone⁸. YcbB was subsequently reported to participate in PG maintenance as it compensated defects in lipopolysaccharide export¹⁵.

The D,D-transpeptidase activity of PBPs was identified as the primary target of β -lactams in the 1960s¹⁶. Nevertheless, deciphering the downstream cascade of events that leads to bacterial death poses particular challenges and remains the subject of intense investigations¹⁷⁻²⁰. In this study we investigate the functions that are essential for the rescue of PBPs by the 3 \rightarrow 3 cross-linking activity of L,D-transpeptidase YcbB at the genome scale. Results are based on Tn-seq identification of genes essential for YcbB-mediated β -lactam

resistance, construction of multiple gene deletions to decipher epistatic relationships, and determination of the structure of PG by mass spectrometry (Fig. 1D and 1E). This analysis opened a new window on the evolvability of the cell envelope, on the complex network of interactions that pertain to the homeostasis of envelope polymers, and on the mechanisms that *E. coli* develops to fight against the stress induced by β -lactam-mediated D,D-transpeptidase inactivation.

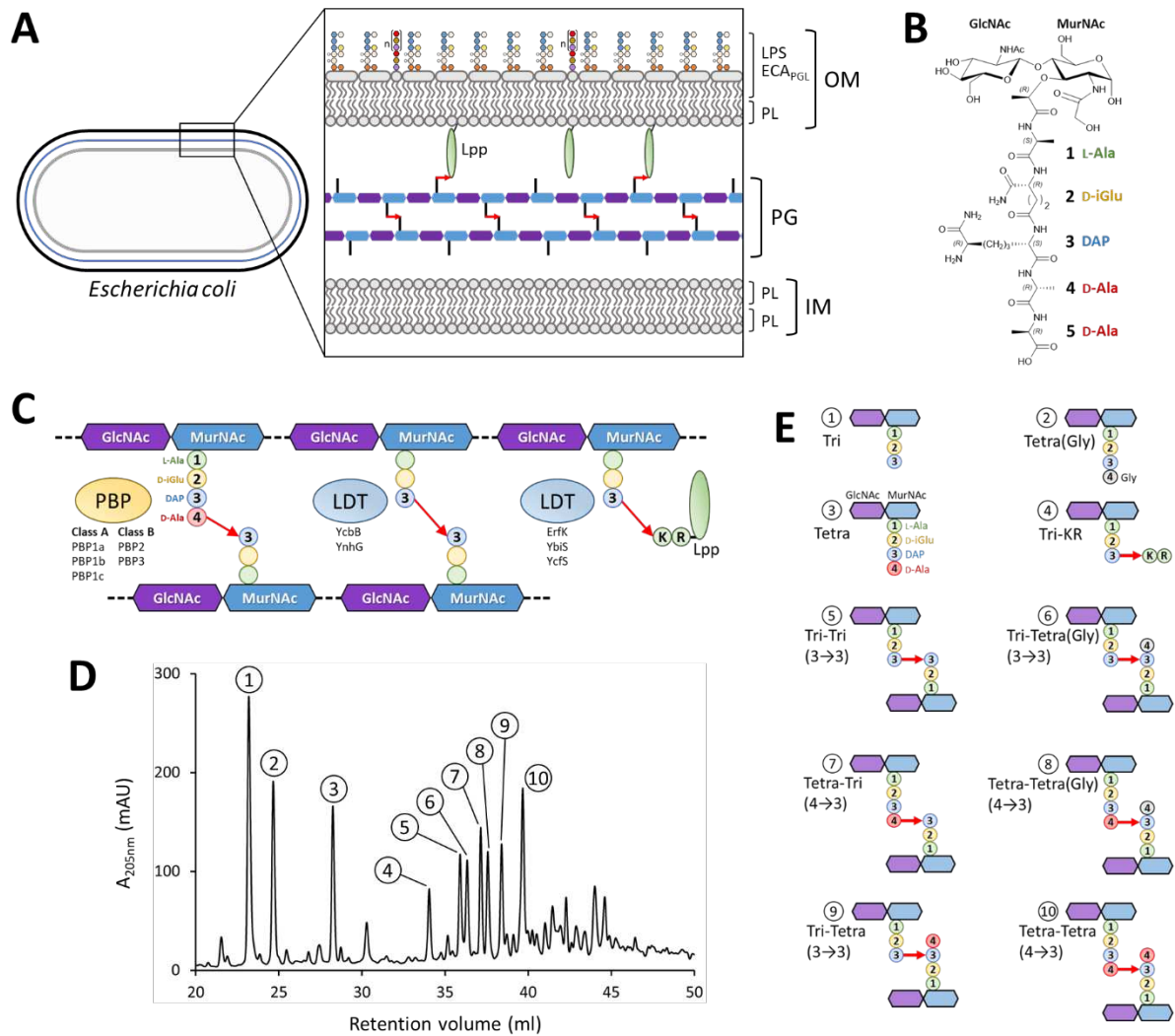


Figure 1. Structure of the multilayered *E. coli* envelope. (A) The envelope is composed of inner (IM, gray) and outer (OM, black) membranes. Peptidoglycan (PG, blue) ensures osmotic protection of the bacterial cell. The IM is a lipid bilayer composed mainly of phospholipids (PL). The OM is an asymmetric lipid bilayer: the inner leaflet is composed of PL and the outer leaflet of lipopolysaccharides (LPS) and phosphatidylglycerides substituted by the enterobacterial common antigen (ECA_{PG}). (B) Structure of the PG subunit (GlcNAc, *N*-acetyl-glucosamine; MurNAc, *N*-acetyl-muramic acid). (C) PG is a net-like macromolecule made of glycan chains (blue-purple polygons) cross-linked together by short peptide stems (colored circles). PBPs catalyze the formation 4→3 cross-links connecting the 4th position of an acyl donor stem to the 3rd position of the acceptor. Two members of the LDT family (YcbB and YnhG) catalyze the formation 3→3 cross-links. Three LDTs (ErfK, YbiS, and YcfS) anchor the Braun lipoprotein (Lpp) to the PG. Linking DAP at the 3rd position of a PG donor stem to the Arg-Lys extremity of

the Lpp provides a covalent link between the OM and the PG. The PG-Lpp link is hydrolyzed by the YafK LDT^{21,22}. (D) *rp*HPLC profile of muropeptides from strain BW15113(*ycbB*, *relA'*) grown without ceftriaxone. Structure is inferred from the fragments obtained by digestion of PG with muramidases which cleave the MurNAc-GlcNAc β -1,4 bond. (E) Structure of the muropeptides deduced from mass spectrometry analyses.

RESULTS

Identification of genes essential for YcbB-mediated β -lactam resistance. A transposon sequencing (Tn-seq) approach was used to identify genes essential for YcbB-mediated β -lactam resistance in the genome of *E. coli* BW15113(*ycbB*, *relA'*)²³. Two experimental conditions, absence (-CRO) or presence (+CRO) of ceftriaxone, were compared. For both conditions, IPTG and L-arabinose were added in order to induce genes encoding the YcbB L,D-transpeptidase and the RelA' (p)ppGpp synthase, respectively. Genomic DNA extraction was performed on pools of 810,000 (-CRO) and 260,000 (+CRO) transformants and sequenced. Technical duplicates of independent DNA extractions revealed R² correlation coefficients of 0.90 and 0.94 for the -CRO and +CRO conditions, respectively (Fig. 2A and B). Junction-containing sequences were aligned to the *E. coli* BW25113 reference genome and essential genes identified by quantifying the presence of gaps in the insertions (Fig. 2C). The average numbers of reads per gene were compared to identify genes in which transposon insertions were significantly (*p*-value < 0.05) underrepresented in the +CRO condition (Fig. 2D; Supplementary Data File 1A).

The Tn-seq analyses revealed that, among the 4,309 annotated CDSs, 179 were selectively essential in the +CRO condition according to a stringent combination of three criteria including (i) the presence of a gap in transposon insertions, (ii) a significant *p*-value (< 0.05), and (iii) a fold-change larger than 4 (See Materials and Methods) (Supplementary Data File 1B). No genes were found to be selectively essential in the -CRO condition. The 179 +CRO selectively essential genes were assigned to seven functional categories with a majority found to be involved in the metabolism of envelope components (N = 71, 40%) and in stress responses (N = 35, 20%) (Fig. 2E). Relevant Tn-seq profiles of genes discussed in this study have been compiled in Supplementary Data File 2.

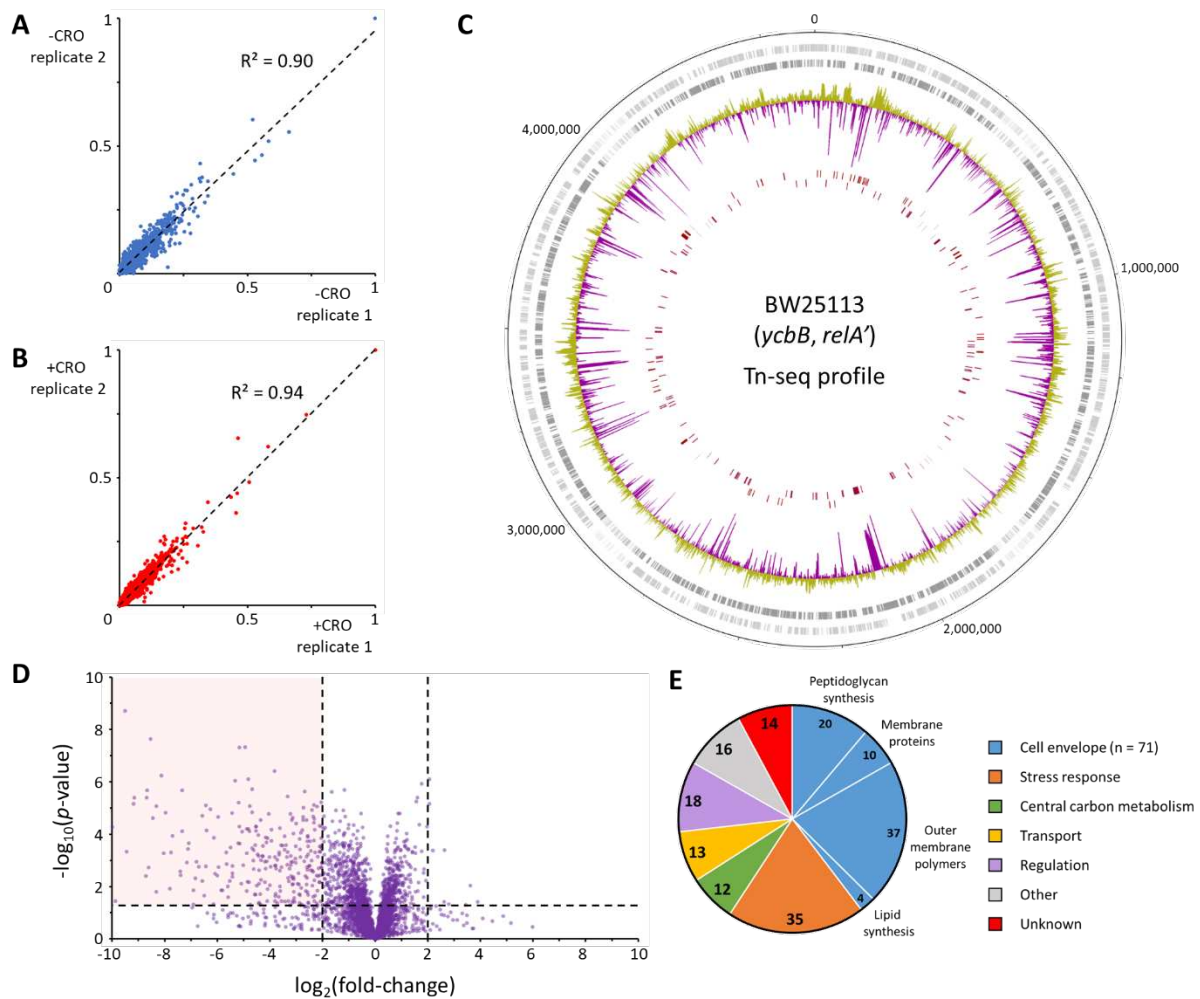


Figure 2. Genome-wide transposon sequencing in *E. coli* BW25113(*ycbB, relA'*) grown in the absence (-CRO) or presence (+CRO) of ceftriaxone. (A and B) Correlation of normalized average read numbers per CDS for two sequenced technical replicates obtained for the -CRO and +CRO conditions, respectively. (C) Frequency and location of transposon insertions. Rings, outermost to innermost, correspond to: (i) the BW25113 coordinates; (ii) the sense (light gray) and antisense (gray) CDSs; (iii) the \log_2 of the fold-change of insertion for the -CRO versus +CRO conditions. Data for -CRO to +CRO ratios smaller and greater than 1 appear in yellow and purple, respectively; and (iv) the sense and antisense CDSs specifically essential in the +CRO condition, respectively. (D) The volcano plot represents genes for which transposon inactivation is beneficial or detrimental in the +CRO condition. The X-axis represents the \log_2 of the fold-change of the average reads per gene for the -CRO versus +CRO conditions. The Y-axis represents the negative \log_{10} of the p -value. The pink area corresponds to genes with an at least 4-fold lower number of insertions in the +CRO condition with a p -value < 0.05. (E) Biological functions of genes specifically essential in the +CRO condition.

Divisome disturbances are not tolerated for YcbB-mediated β -lactam resistance. Synthesis of the septum is mediated by components of the divisome that are recruited at mid-cell by the assembly of the FtsZ ring (Fig. 3A)⁶. Proteins of the core divisome, FtsA, FtsEX, FtsQLB, FtsW, FtsZ, ZipA, and PBP3, were each essential both in the -CRO and +CRO conditions. In contrast, divisome-associated proteins involved in the control of the cell cycle (MinCD, FtsK)^{24,25}, in the stabilization of the divisome under stress conditions (FtsP)^{26–28}, and in

providing a physical link with the outer membrane (TolABQR and Pal)²⁹ were only essential in the +CRO condition.

Glycan chain polymerization by the elongasome is required for YcbB-mediated β -lactam resistance. Expansion of the side-wall of peptidoglycan is mediated by the elongasome (Fig. 3B), which includes (i) RodA, a glycosyltransferase belonging to the shape, elongation, division and sporulation (SEDS) protein family, (ii) PBP2, a catalytically mono-functional class B PBP with D,D-transpeptidase activity, and (iii) MreB, an actin-like protein forming a cytoskeleton that controls the localization and movement of the elongasome complex⁶.

Previous analyses established that the elongasome is dispensable for growth in mutants overproducing the (p)ppGpp alarmone^{30,31}. As expected, Tn-seq analysis indicated that each of the six elongasome genes (*mrda*, *rodA*, *rodZ*, *mreB*, *mreC*, and *mreD*) were dispensable for growth in the -CRO condition, which included L-arabinose for production of (p)ppGpp by RelA' (Fig. 3C). Growth of the elongasome mutants was further dependent upon expression of the *relA'* (p)ppGpp synthase gene (Supplementary Fig. S2A). Strikingly, the six elongasome genes were each essential in the +CRO condition despite (p)ppGpp production (Fig. 3C). The essentiality of PBP2 (encoded by *mrda*) was unexpected given that this PBP could not participate directly in PG cross-linking owing to inactivation of its D,D-transpeptidase domain by ceftriaxone^{8,32}. The components of the elongasome are encoded by compact gene clusters that are highly sensitive to polar effects potentially altering the transcription levels of adjacent genes. We therefore complemented our Tn-seq results using a CRISPR-Cas9 approach (Supplementary Fig. S2B) for one-step site-directed mutagenesis of *mrda* to impair the transpeptidase activity of PBP2. Expression of resistance to ceftriaxone was abolished by deletion of *mrda*, but not by replacement of the catalytic Ser residue of the D,D-transpeptidase by Ala or Cys (Fig. 3D; Supplementary Fig. S2C). Thus PBP2, but not its transpeptidase activity, was essential for drug resistance.

A similar CRISPR-Cas9 approach, applied to the mutagenesis of the glycosyltransferase gene *rodA*, revealed that a catalytically active form of the glycosyltransferase was required for growth in the presence of ceftriaxone (Fig. 3D; Supplementary Fig. S2C). It was previously shown that PBP2, RodZ, MreB, MreC, and MreD are each essential for the assembly of the elongasome, and that the interaction between PBP2 and RodA is not dependent on PBP2 activity³³⁻³⁵. Thus, PG cross-linking by YcbB required polymerization of glycan chains by RodA

in a functional elongasome containing both RodA and PBP2, with the transpeptidase activity of the latter enzyme being dispensable.

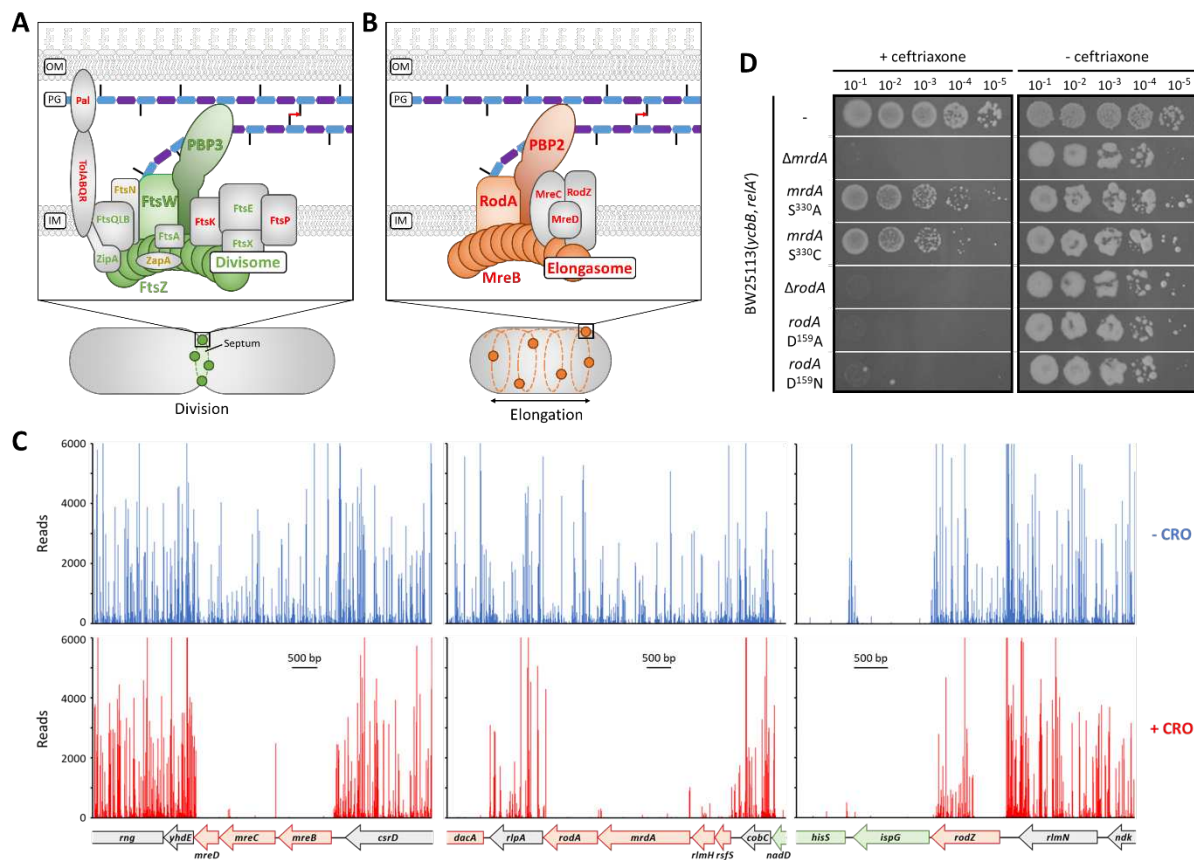


Figure 3. Tn-seq evaluation of genes encoding components of the PG polymerization complexes. (A) and (B) Schematic representation of the divisome and elongasome. **(C)** Tn-seq insertion profiles of genes encoding components of the elongasome. Reading frames are indicated at the bottom of the panel and color coded: red, genes selectively essential for +CRO; green, genes essential for both -CRO and +CRO; gray, genes unessential in either condition. Transposon insertion sites are indicated by lines above the reading frames with their height reflecting the number of reads for each insertion. **(D)** Essentiality of genes encoding elongasome components PBP2 and RodA tested by site-directed mutagenesis. Plating efficiency was tested in the presence of ceftriaxone at 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (+ ceftriaxone) or without drug (- ceftriaxone) on BHI agar plates supplemented with 40 μM IPTG and 1% L-arabinose for induction of *ycbB* and *relA'*, respectively. Plates were incubated at 28 $^{\circ}\text{C}$ since the strains harboring the *mrda* S³³⁰A and *mrda* S³³⁰C did not grow in the presence of ceftriaxone at 37 $^{\circ}\text{C}$.

Recycling of peptidoglycan fragments is dispensable for YcbB-mediated β -lactam resistance.

In *E. coli*, 40% to 50% of the PG is degraded per generation with >90% of the resulting muropeptides recycled by the cell^{36,37}. This involves the retrograde transport of PG fragments into the cytoplasm by specialized permeases, AmpG and the Opp complex, followed by the recycling of the sugar and peptide moieties as glucosamine and tripeptide L-Ala- γ -D-Glu-DAP, respectively (Fig. 4A). Tn-seq analysis showed that genes encoding the AmpG permease and

each component of the Opp complex were fully dispensable for growth both in -CRO and +CRO conditions. We further demonstrated that PG recycling was fully dispensable by constructing a $\Delta ampG \Delta oppF \Delta mppA$ triple mutant that was found to be viable and resistant to ceftriaxone in spite of the loss of both transporters (Supplementary Fig. S3A). Nevertheless, the cytoplasmic L,D-carboxypeptidase LdcA was essential in the +CRO but not in the -CRO condition. This enzyme was previously shown to trim D-Ala⁴ from recycled tetrapeptide stems to provide the L-Ala- γ -D-Glu-DAP tripeptide that is directly added to UDP-MurNAc by the Mpl ligase^{38,39}. Disruption of the gene encoding LdcA was reported to result in bacteriolysis during stationary growth, attributed to dramatically decreased cross-linking as recycled tetrapeptide stems cannot serve as acyl donors by D,D-transpeptidases (Supplementary Fig. S1)³⁹. The same explanation cannot account for the essential role of LdcA in ceftriaxone resistance since YcbB uses tetrapeptide stems as acyl donors⁸. Nonetheless, the essential role of LdcA in the +CRO condition stemmed from elimination of imported tetrapeptides since deletion of the *mpl* gene restored growth of the $\Delta ldcA$ mutant in the presence of ceftriaxone (Supplementary Fig. S3A). Overexpressing *murA*, encoding the enzyme catalyzing the first committed step of PG synthesis (Fig. 4A), also restored resistance of the $\Delta ldcA$ mutant (Supplementary Fig. S3B). Thus, boosting the metabolic flux through the PG assembly pathway compensates for the toxicity of the imported tetrapeptides. Together, these results indicate that Mpl ligates the tetrapeptide onto UDP-MurNAc and that in the absence of LdcA the resulting tetrapeptide-containing precursors are ineffectively used in subsequent PG synthesis steps and impair the global efficacy of the pathway.

Consequences of replacement of *meso*DAP by L,L-DAP in PG precursors on resistance and envelope synthesis. DapF, which converts L,L-DAP into *meso*DAP, was reported to be dispensable for growth in *E. coli*. MurE ligase catalyzes the addition of L,L-DAP to UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu, albeit less effectively than the addition of *meso*DAP due to a 3,000-fold difference in K_m ⁴⁰. Since epimerization of L,L-DAP by DapF is the only source of *meso*DAP in *E. coli*, this implies that PBPs are able to cross-link stem peptides containing L,L-DAP instead of *meso*DAP. Concordantly, *dapF* was unessential in the -CRO condition. On the contrary, no transposon insertions were found in this gene in the +CRO condition. Lethality was not due to the inability of YcbB to cross-link L,L-DAP-containing stem peptides since 3 \rightarrow 3 cross-linked dimers were detected in a $\Delta dapF$ mutant (Supplementary Fig. S4). Likewise, deletion of *dapF* did not

prevent the anchoring of the Braun lipoprotein to the PG. Thus, L,D-transpeptidases, similarly to PBPs, tolerated the replacement of *meso*DAP by L,L-DAP. The essentiality of *dapF* in the +CRO condition may therefore be accounted for by a reduced efficacy of the PG assembly pathway, as observed above for the *ldcA* null mutant.

Essentiality of redundant and non-redundant peptidoglycan biosynthetic enzymes.

Excepting *dapF*, all genes encoding enzymes involved in PG biosynthetic steps known to be performed by a single enzyme were identified as essential in both +CRO and -CRO conditions (Fig. 4A). The essentiality of genes encoding redundant enzyme functions was not expected and is reported in Supplementary Fig. S5.

Accumulation of capsule intermediates abolished YcbB-mediated β -lactam resistance.

The outermost polymer of the cell wall of most *E. coli* strains is a capsule made of colanic acid⁴¹. All but one colanic acid biosynthetic enzymes, *WcaJ*, were specifically essential in the +CRO condition (Fig. 4B, 4C, and 4D). *WcaJ* catalyzes the first committed step in the assembly of the colanic acid precursor, indicating that this polymer is unessential for growth in the presence of ceftriaxone. Given that the loss of all other colanic acid biosynthesis enzymes is expected to result in accumulation of undecaprenyl-linked precursors, we concluded that these enzymes are essential for preventing the sequestration of the lipid transporter. According to this model, sequestration of C₅₅ would indirectly inhibit the assembly of other polymers, such as the essential PG, that rely on the same lipid carrier. As confirmation, we showed that deletion of the gene encoding *WcaJ* enabled growth of a *WcaJ* mutant in the presence of ceftriaxone (Supplementary Fig. S6A). Combined, these results indicate that the capsule is, in itself, unessential for growth in the presence of ceftriaxone although biosynthetic enzymes are essential to prevent reduced PG synthesis by sequestration of the lipid carrier.

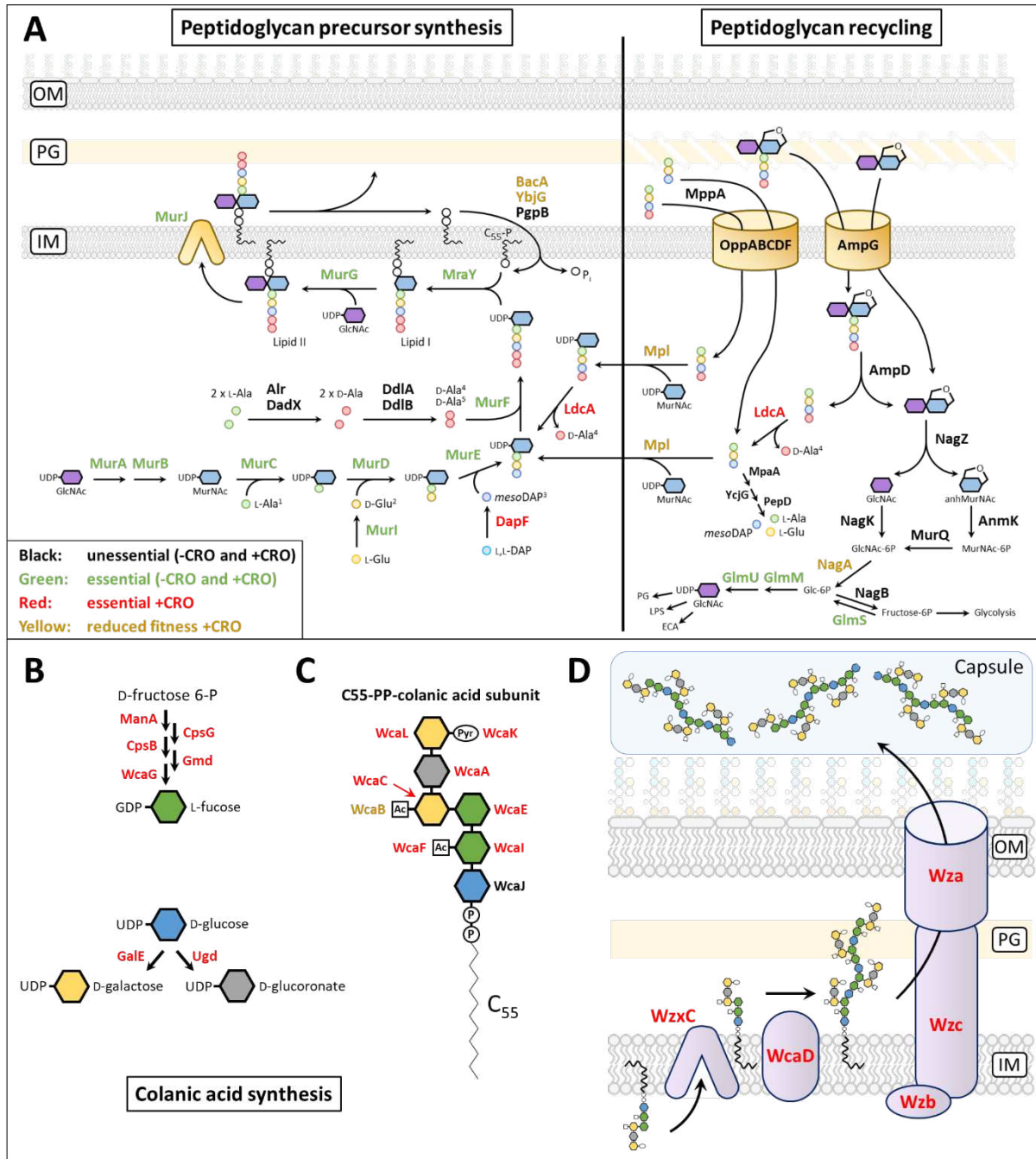


Figure 4. Essentiality of genes involved in PG recycling and colanic acid biosynthesis. (A) The PG subunit is assembled both by *de novo* synthesis (left) and recycling of PG fragments (right). **(B)** Synthesis of colanic acid nucleotide sugar precursors. **(C)** Assembly of the colanic acid subunit linked to the undecaprenyl lipid carrier. **(D)** Polymerization and transport of colanic acid to the cell surface. Abbreviations: Ac, acetyl; C₅₅, undecaprenyl lipid transporter; IM, inner membrane; OM, outer membrane; P, phosphate; Pyr, pyruvate.

Outer-membrane enterobacterial common antigens (ECAs) are required for YcbB-mediated β-lactam resistance. Three ECA polymers are assembled from the same C₅₅-linked precursor (Fig. 5)⁴². ECAs composed of 1 to 14 units of the precursor are covalently linked to

lipopolysaccharides (ECA_{LPS}) or to phosphatidylglycerides (ECA_{PGL}) in the outer leaflet of the outer membrane. Free cyclic ECAs (ECA_{CYC}), made of four units, are located in the periplasm.

None of the three ECA polymers were essential in the -CRO condition since transposon insertions were detected in genes encoding enzymes involved in the synthesis of nucleotide-sugar precursors (Fig. 5A) and for the assembly of the C₅₅-linked trisaccharide subunit (Fig. 5B). In contrast, most enzymes were essential in the +CRO conditions indicating that at least one of the three ECA polymers was essential for resistance. Synthesis of both ECA_{LPS} and ECA_{CYC} was dispensable for resistance since deletion of the genes encoding the WaaL and WzzE ligases, alone or in combination, was dispensable for growth in the presence of ceftriaxone (Fig. 5C; Supplementary Fig. S6B). By elimination, these results indicate that synthesis of ECA_{PGL} is essential for resistance although this could not be directly established as the corresponding polymerase has not yet been identified.

Synthesis of the core sugars of lipopolysaccharides (LPS) is essential for YcbB-mediated β -lactam resistance. Lipid A, substituted by two 3-deoxy-D-manno-octulosonate residues, is known to be the minimal moiety of LPS required for growth of *E. coli*⁴³. Accordingly, most enzymes involved in its synthesis and transport to the outer membrane were essential in the -CRO and +CRO conditions (Fig. 5D, 5E, and 5F). Downstream enzymes, responsible for synthesis of the ADP-L-glycero-D-manno-heptose subunit (RpiA, Rpe, GmhA, HldE, GmhB, HldD), the addition of a D-manno-heptose to the saccharide chain (WaaC), and the phosphorylation of this residue (WaaP), were essential only in the +CRO condition. Additions a 2nd D-manno-heptose (WaaF) and a D-glucose (WaaG) residues were also essential for resistance. The enzymes catalyzing the three subsequent steps in the assembly of the outer core (WaaQ, B, and R) were required for optimal growth in the +CRO condition. Only three enzymes of the pathway (WaaY, J and U) were fully dispensable both in the -CRO and +CRO conditions. These results indicate that growth in the presence of ceftriaxone was not compatible with incomplete synthesis of LPS.

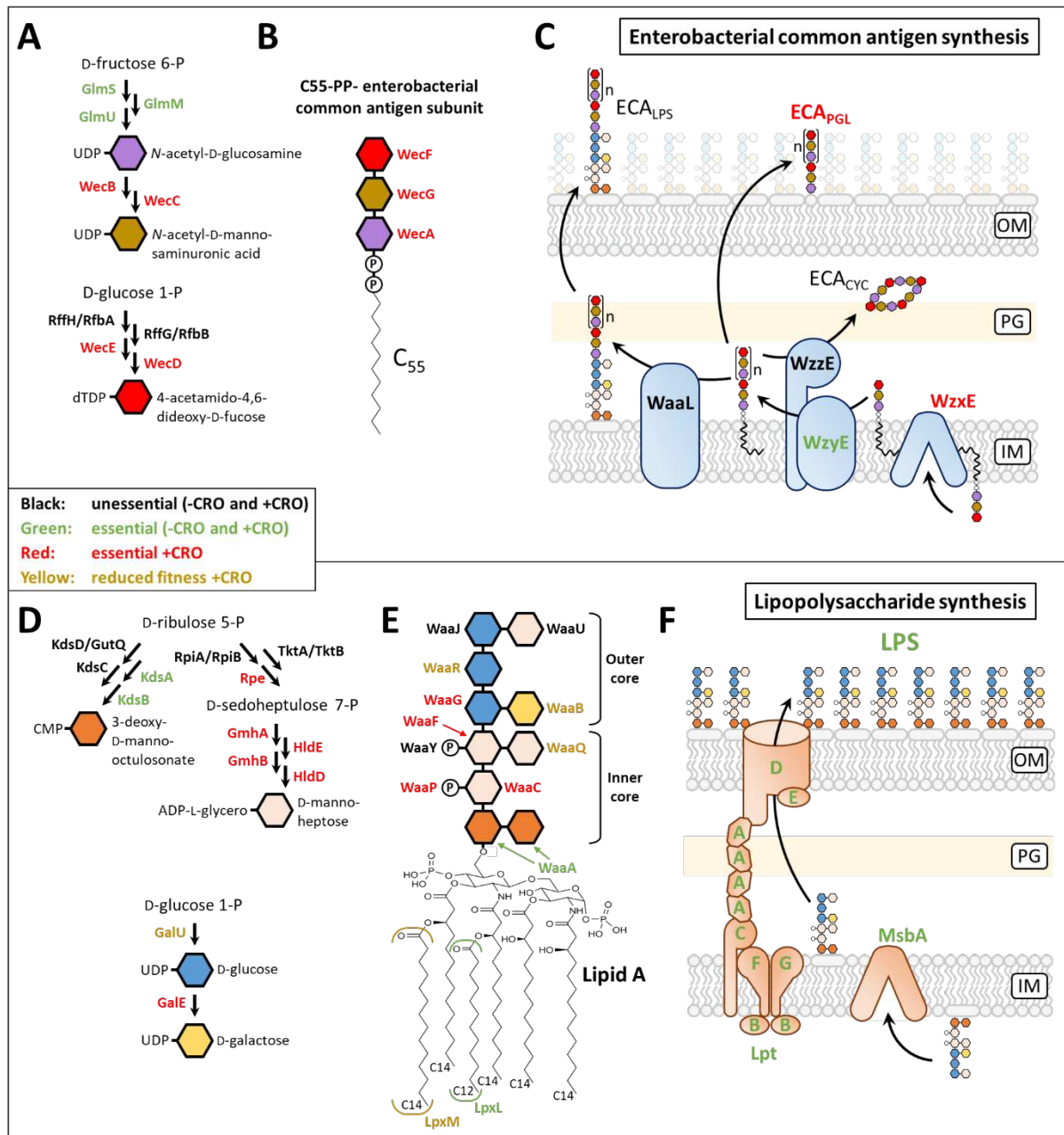


Figure 5. Enterobacterial common antigen (ECA) and lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis. (A) Synthesis of ECA nucleotide-sugar precursors. (B) Assembly of the ECA subunit linked to the undecaprenyl lipid carrier. (C) Polymerization and transport of ECAs to the cell surface. (D) Synthesis of core LPS nucleotide-sugar precursors. (E) Assembly of the core LPS. (F) LPS transport to the cell surface. Abbreviations: C₅₅, undecaprenyl lipid transporter; IM, inner membrane; OM, outer membrane; P, phosphate.

Growth with β -lactams impacts the anchoring of the Braun lipoprotein to peptidoglycan.

The Tn-seq analysis showed that the Braun lipoprotein is dispensable for growth in both -CRO and +CRO conditions. Analyses of the PG structure (Supplementary Fig. S7) revealed that growth in the presence of ceftriaxone dramatically reduced the anchoring of the Braun lipoprotein to PG. Thus, ceftriaxone may inhibit the anchoring reaction catalyzed by LDTs

(Supplementary Fig. S1C). Competition of LDTs for the same mucopeptide donor, as previously proposed²², may also contribute to limiting the anchoring of the Braun lipoprotein to PG. However, this appears less likely since the high proportion of 3→3 cross-links in the -CRO conditions (40%) was not detrimental to the anchoring of the lipoprotein (Supplementary Fig. S7).

Growth with β -lactams impacts the outer membrane permeability barrier. Having assessed the role of outer membrane components on the integrity of the outer membrane in the presence of ceftriaxone, our next objective was to determine its functionality as a permeability barrier. In the absence of inducers of *ycbB* and *relA'*, hydrolysis of chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG) by the cytoplasmic LacZ β -galactosidase was detected in a narrow ring at the perimeter of the ceftriaxone inhibition zone (Fig. 6A). Thus, exposure to subinhibitory concentrations close to the minimal inhibitory concentration (MIC) of the drug resulted in increased permeability. Upon induction of *ycbB* and *relA'*, LacZ activity was detected in a large zone showing that ceftriaxone increased permeability at concentrations that were much lower than the MIC of that strain. Growth in the presence of ceftriaxone sensitized the bacteria to sodium dodecyl sulfate (SDS) resulting in a > 40-fold reduction of the MIC of the detergent (Fig. 6B). Growth in the presence of ceftriaxone also increased susceptibility to vancomycin, moenomycin, bacitracin, and erythromycin, which are known to poorly penetrate the outer membrane of Gram-negative bacteria (Fig. 6C). Together, these data indicate that bypass of PBPs by YcbB was associated with the permeabilization of the outer membrane in the presence of ceftriaxone. This implies that the mode of action of β -lactams may involve a positive loop in which binding of the drugs to their targets promotes drug access to the periplasm.

DISCUSSION

The targets of β -lactams and the mechanism of their inactivation have been known for decades, and yet an understanding of the downstream cascade of events that leads to bacterial cell death remains elusive. The most recent model (Fig. 6D) proposes that inactivation of PBPs results in the production of uncross-linked glycan chains in the periplasm and in their subsequent cleavage by lytic enzymes^{18,20}. The anabolic demand generated by this

futile cycle of PG synthesis and degradation engenders alterations in central carbon metabolism, protein synthesis, and ATP utilization leading to the production of reactive oxygen species (ROS) that damage biomolecules, including DNA, RNA, proteins, and lipids. The resulting oxidative stress contributes to cell death^{17,44}.

The rescue of PBP inactivation by YcbB implies, in its simplest sense, a bypass of the cross-linking activity of PBPs, by the replacement of 4→3 by 3→3 cross-links (Fig. 1). However, our analysis shows β -lactam resistance to be significantly more complex since the toxic effects of the inactivation of PBPs persisted despite the bypass of their D,D-transpeptidase activity by YcbB. The genes identified as selectively essential in the +CRO condition (Fig. 2) revealed the complexity of functions that are mobilized to mitigate these toxic effects (Fig. 6E).

Uncoupling of RodA-mediated transglycosylation from PBP2-mediated transpeptidation upon inactivation of this PBP by β -lactams was previously shown to have opposite effects on the viability of susceptible and resistant bacteria. In susceptible bacteria, accumulation of uncross-linked glycan strands is deleterious and their degradation by the lytic transglycosylase SltY contributes to cell survival²⁰. In contrast, inactivation of SltY favors YcbB-mediated resistance, with uncross-linked glycan strands formed by the elongasome complex serving as suitable substrates for the assembly of a functional PG polymer⁷. Pulse-labeling experiments indicated that YcbB supported PG polymerization via a two-step mechanism involving (i) assembly of 3→3 cross-linked glycan strands followed by (ii) insertion of the resulting neo-synthesized polymer into the existing PG⁴⁵. In the present work we provide direct evidence that this mode of peptidoglycan polymerization requires a functional elongasome, supporting glycan strand polymerization by catalytically active RodA (Fig. 3).

PG recycling is stimulated in the +CRO condition⁴⁵. This implies that the rescue of PBPs by YcbB reduces but does not abolish the high anabolic demand necessary to feed the PG assembly pathway in the presence of the drug. Here we show that reducing the metabolic flux of precursors in the PG assembly pathway is not compatible with YcbB-mediated β -lactam resistance. This was observed to be the case for *dapF* or *ldcA* deletions, which led to the synthesis of aberrant precursors containing L,L-DAP or a tetrapeptide stem, respectively (Fig. 4A). This was also the case for inactivation of genes encoding colanic acid synthesis enzymes that led to the sequestration of the undecaprenyl lipid transporter competitively used for PG synthesis (Fig. 4B, 4C and 4D). The residual excess in the anabolic demand may also have

consequences not directly linked to the efficacy of PG synthesis. Indeed, an elevated anabolic demand implies that ROS production remains elevated. The successful defense against the resulting oxidative stress may account for the selectively essential roles of regulators, chaperones, and enzymes involved in the repair of macromolecules (Fig. 1E; Supplementary Table S1).

Surprisingly, we found that resistance also depended on ECA_{PGL} (Fig. 5A), LPS bearing a full core sugar (Fig. 5B, 5C and 5D), on components of the Tol-Pal system (Fig. 3A), and on outer membrane proteins including OmpA and OmpC (Supplementary Data file 1B). Bacterial morphology analyses recently showed that the outer membrane directly contributes to the mechanical properties of the cell envelope, a role historically attributed solely to the PG layer^{46,47}. Strikingly, the stabilizing components essential for the stiffness of the outer membrane identified in one of these previous reports⁴⁶ included LPS bearing a full core sugar, the Tol-Pal system, and OmpA, also identified here as essential for YcbB-mediated ceftriaxone resistance. Thus, assembly of a functional envelope in the presence of ceftriaxone required both the bypass of the D,D-transpeptidase activity of PBPs by the L,D-transpeptidase activity of YcbB and the insertion of critical polymers in the outer membrane.

In conclusion, the rescue of PBPs by YcbB, coupled to a genome-wide Tn-seq screen, revealed three unexpected impacts of β -lactams. First, exposure to ceftriaxone conditionally prevented L,D-transpeptidase-mediated anchoring of the Braun lipoprotein to PG and increased outer membrane permeability (Supplementary Fig. S7; Fig. 6), which is, in itself, a previously unrecognized mode of action of β -lactams. Second, the β -lactam-induced futile cycle was only sustainable if the efficacy of the peptidoglycan assembly pathway was not compromised by ineffective biosynthetic steps or by competition with the assembly of other polymers relying on the common undecaprenyl lipid transporter. Third, the PG cross-linked by YcbB was functional although the integrity of the cell envelope heavily relied on outer membrane polymers that were otherwise dispensable for growth. Thus, identification of the genes involved in the rescue of PBPs by YcbB provided a positive screen to identify bacterial responses that prevent bacterial killing by β -lactams. In contrast, metabolic analyses restricted to susceptible bacteria are insensitive to differences between antibacterial-specific perturbations and the multitude of side effects related to cell death¹⁸. Accordingly, our analysis provides convincing evidence that the outer membrane, beyond its well-known role

as a permeability barrier⁴⁸, is an unsuspected key player in the mode of action of β -lactams and in the mechanism of resistance to these drugs. In turn, our analysis identifies potential actionable targets to boost the efficacy of β -lactams against resistant bacteria.

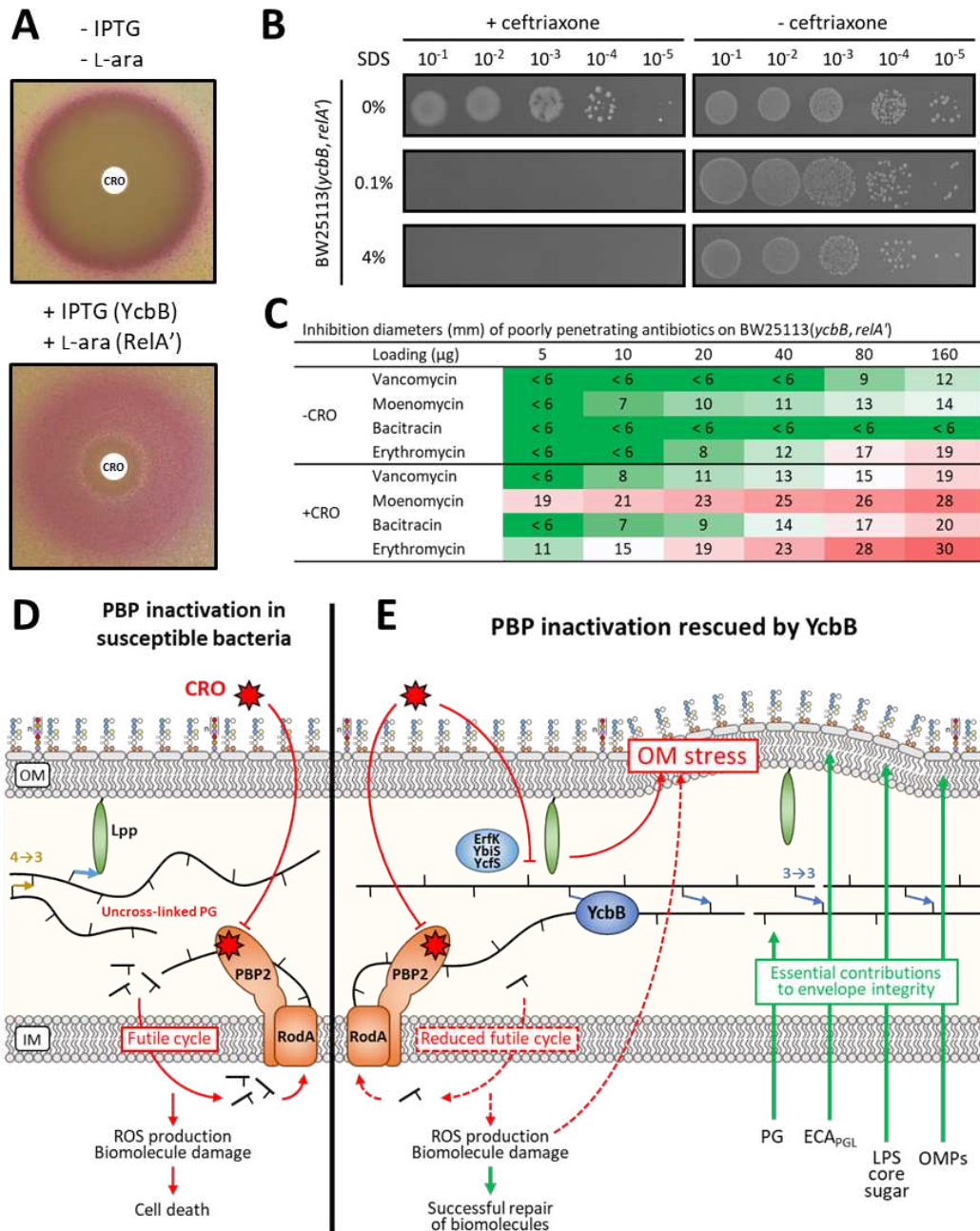


Figure 6. Testing outer membrane permeability in the presence of ceftriaxone. (A) Hydrolysis of chromogenic CPRG at 20 μ g/ml by cytoplasmic LacZ⁴⁹. The disks were loaded with 30 μ g ceftriaxone. (B) Plating efficiency in the presence of SDS. Growth was tested in the presence of ceftriaxone at 8 μ g/ml (+ ceftriaxone) or in the absence of the drug (- ceftriaxone) on BHI agar plates supplemented with 40 μ M IPTG and 1% L-arabinose for induction of *ycbB* and *relA'*, respectively. (C) Inhibition diameters of drugs that do not penetrate the outer membrane of wild-type *E. coli*. Values are the median of 3 biological repeats. (D) Cascade of events leading to bacterial cell death due to inactivation of PBPs by β -lactams. (E) Rescue of PBP inactivation by the YcbB L,D-

transpeptidase. Abbreviations: IM, inner membrane; OM, outer membrane; Lpp, Braun lipoprotein; OMPs, outer membrane proteins.

MATERIAL AND METHODS

Strains, plasmids, and growth conditions. The characteristics and origin of plasmids and strains used in the study are listed in Supplementary Table S1. Bacteria were grown at 37 °C in brain heart infusion (BHI; Difco) agar or broth with aeration (shaking @ 180 rpm). Kanamycin at 50 µg/ml was used for selection of transductants carrying the Km^R cassette obtained from the Keio collection. The growth media were systemically supplemented with drugs to counter-select plasmid loss: 10 µg/ml tetracycline for plasmid pKT2, 20 µg/ml chloramphenicol for pKT8, 25 µg/ml zeocin for pHV30 and derivatives. Induction of the *P_{trc}*, *P_{araBAD}*, and *P_{rhaBAD}* promoters was performed with isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, 40 µM), L-arabinose (1%), and L-rhamnose (0.2%), respectively. Plasmids constructed in this study were obtained by using NEBuilder HiFi DNA assembly (New England Biolabs) method, unless otherwise specified. Deletions of specific genes were obtained by P1 transduction of the Km^R cassette of selected mutants from the Keio collection^{50,51}. For multiple gene deletions, the Km^R cassette was removed by the FLT recombinase encoded by plasmid pCP20.

Insertion library construction. A fresh colony of *Escherichia coli* BW25113 $\Delta relA$ pKT2(*ycbB*) pKT8(*relA'*) was grown in 10 ml of BHI broth supplemented with 10 µg/ml tetracycline and 20 µg/ml chloramphenicol. At an optical density at 600 nm (OD_{600nm}) of ca. 0.8, cells were harvested by centrifugation and washed four times with 10 ml H₂O at 4 °C. Multiple electroporations (see below) were performed using 100 µl of electrocompetent cells and 1 µl of EZ-Tn5 <KAN-2> transposome[®] (Lucigen). For each electroporation, transformed cells were incubated at 37 °C for 1 h in 2 ml of BHI broth supplemented with 10 µg/ml tetracycline and 20 µg/ml chloramphenicol. Cells were plated on 20 BHI agar plates (100 µl per plate) supplemented with 50 µg/ml kanamycin, 40 µM IPTG, and 1% L-arabinose in the absence (condition -CRO) or presence (condition +CRO) of 8 µg/ml ceftriaxone. Plates were incubated at 37 °C for 16 h (condition -CRO) or 24 h (condition +CRO). Cells were recovered from sets of 20 plates (corresponding to the same electroporation) in two steps by scrapping with 4 ml of BHI broth containing 20% glycerol followed by an additional wash of the plates with 4 ml of the same medium. The bacterial suspensions obtained for each electroporation were kept at -80 °C. For the -CRO condition, a

total of 810,000 CFUs was obtained in 7 electroporations. For the +CRO condition, a total of 260,000 CFUs was obtained in 10 electroporations.

For DNA extraction, 10 µl of the bacterial suspensions obtained in the 7 (-CRO condition) or 10 (+CRO condition) electroporations were pooled. DNA extraction was performed with the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega) in duplicate to obtain technical repeats.

Junction fragments sequencing. The preparation of DNA libraries and the Illumina sequencing were performed by ViroScan3D company and the ProfileXpert platform of the Université de Lyon 1. Briefly, DNA was fragmented (*ca.* 300 bp) and P5 Illumina adapters were linked to the fragmented DNA. Junction fragments on both sides of EZ-Tn5 were amplified using standard P5 Illumina primer in association with Tn5-hybridizing primer HV1 or HV2 carrying the P7 Illumina adapter on the 5' end (Supplementary Table S1). Indexes were carried by the Tn left or Tn right primers. Illumina sequencing was performed on a NextSeq Mid Output 150 bp (paired-end: 40-110). Demultiplexing and trimming of the reads were performed prior to the alignment with the *E. coli* BW25113 reference genome (NCBI accession number: CP009273).

Tn-seq data analysis. Analysis was performed with the Python (v.3.7) package TRANSIT (v.3.0+)⁵². The TPP component was used to process raw experimental reads and generate WIG files for downstream analysis. Illumina paired ends reads with EZ-Tn5 insertion sites were identified by first selecting those with the expected 'TAAGAGACAG' transposon end sequence between nucleotides 25 and 50 of each read. The 110 bp reverse sequence (Adapter P7 sequencing primer) was used in all cases as it contained both EZ-Tn5 and genomic sequences. EZ-Tn5 reads were then mapped to the *E. coli* BW25113 reference sequence using BWA (v.0.7.17)⁵³. Combined WIG files corresponding to left and right junctions were generated for each experiment. Transposon insertion events were assigned to specific open reading frames / genes using the GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/>) GFF3 file corresponding to the FASTA genomic sequence. Normalization of the number of inserts per ORF / gene was performed by Trimmed Total Reads (TTR): total read-counts normalized after trimming top and bottom 5% of read-counts. Mean insertion counts were calculated for each experimental condition: mean of left and right junctions from each of two experiments.

Determination of gene essentiality and fitness cost. The junction fragments were aligned to the *E. coli* BW25113 reference genome and the essential genes were called by using the Tn5Gaps algorithm of the TRANSIT pipeline (Supplementary File 1A)⁵². The set of selectively

essential gene in the +CRO condition were constructed by: (1) Identification of genes essential in the two replicates of the +CRO and not essential in the two replicates of the -CRO (subset 1). (2) Adding genes with one discrepancy among technical duplicates, e.g., marked as unessential in one +CRO dataset or essential in one -CRO dataset (subset 2). (3) Average reads per gene were calculated to identify transposon insertions that are significantly (p -value < 0.05) underrepresented in the +CRO condition (Supplementary Data File 1A). Genes from subset 1 & 2 that yielded a p -value > 0.05 or a fold-change < 4 were eliminated. The resulting set of 179 genes is listed in Supplementary Data File 1B. For pathways or gene clusters containing selectively essential genes in the +CRO condition, we also considered unessential genes displaying a significantly reduced number of insertions in the +CRO condition (p < 0.05). These genes were deemed to incur a fitness cost.

Plasmids and donor DNAs construction for CRISPR-Cas9 mutagenesis. The 20-nucleotide guiding sequences targeting *mrda* (GTCTACAGTTAAACCCTATG) and *rodA* (GGTGGCTGCACAGCCTGACC) were independently introduced in plasmid pTargetF⁵⁴ by inverted PCR amplification using the primers HV3 and HV4 or HV5 and HV6 (Supplementary Table S1) to generate pTargetF-*mrda* and pTargetF-*rodA*, respectively. Briefly, pTargetF was amplified by PCR with Phusion DNA polymerase (Thermo Scientific), the PCR products were digested by DpnI restriction enzyme (Thermo Scientific) and purified by agarose gel electrophoresis. Purified PCR products were phosphorylated and ligated with the T4 Polynucleotide Kinase and the T4 DNA ligase (Thermo Scientific) in a one pot reaction and the resulting pTargetF-*mrda* and pTargetF-*rodA* plasmids were introduced into *E. coli* TOP10 by electroporation.

The *mrda* S³³⁰A, *mrda* S³³⁰C, *rodA* D¹⁵⁹A, *rodA* D¹⁵⁹N, Δ *mrda* and Δ *rodA* donor DNAs were synthesized by GeneCust and cloned in pUC57. Donor DNAs used to introduce point mutations correspond to the sequence of the *mrda* or *rodA* with missense mutation in the codon of interest and silent mutations in the sequence corresponding to the 20 nucleotides used to guide Cas9 on the chromosomal copy of the gene (to prevent subsequent cleavage by Cas9 after allelic exchange). Donor DNAs used to introduce deletions correspond to the 100 bp upstream, the first six codons, the last eight codons and the 100 bp downstream sequences of *mrda* or *rodA*. The donor DNAs were independently amplified by PCR with Phusion DNA polymerase (Thermo Scientific) and primers HV7 to HV14 depicted in Supplementary Table S1. PCR products were

digested with DpnI restriction enzyme (Thermo Scientific) and purified by agarose gel electrophoresis.

CRISPR-Cas9-mediated deletions and point mutations. Method adapted from Jiang, Y. *et al*⁵⁴. A fresh colony of *E. coli* BW25113 $\Delta relA$ pKT8(*relA'*) pCas was grown at 30 °C with agitation in 10 ml of BHI broth supplemented with 1% L-arabinose to induce expression of both *relA'* and the λ Red system, and with 20 μ g/ml chloramphenicol and 50 μ g/ml kanamycin to counter-select loss of the plasmids. At an OD_{600nm} of *ca.* 0.8, cells were harvested by centrifugation and washed four times with 10 ml H₂O at 4 °C. Bacteria were electroporated with plasmid pTargetF-*mrdA* and the donor DNA *mrdA* S³³⁰A, *mrdA* S³³⁰C or $\Delta mrdA$, or with plasmid pTargetF-*rodA* and the donor DNA *rodA* D¹⁵⁹A, *rodA* D¹⁵⁹N or $\Delta rodA$ with a molecular ratio of 1 plasmid for 5,000 donor DNA molecules. Transformed cells were incubated at 30 °C for 2 h in 1 ml of BHI broth supplemented with 1% L-arabinose, 20 μ g/ml chloramphenicol and 50 μ g/ml kanamycin. Bacteria were plated on BHI agar supplemented with 1% L-arabinose, 50 μ g/ml kanamycin, and 120 μ g/ml spectinomycin and incubated at 30 °C for 24 h. To get rid of pTargetF-*mrdA* or pTargetF-*rodA*, transformants were isolated on the same medium additionally supplemented with 500 μ M IPTG for induction of the pCas-encoded sgRNA targeting the pTargetF plasmid and incubated at 30 °C for 24 h. The chromosomal deletions or point mutations were verified by PCR and Sanger sequencing. To get rid of the thermosensitive pCas plasmid, clones harboring the expected mutations were grown in BHI broth supplemented with 1% L-arabinose and 500 μ M IPTG at 37 °C for 6 h and isolated on BHI agar supplemented with 1% L-arabinose at 37 °C for 16 h. Isolated clones were subcultured in BHI broth supplemented with 1% L-arabinose at 37 °C for 6 h and isolated on BHI agar supplemented with 1% L-arabinose at 37 °C for 16 h. The susceptibility of isolated clones to spectinomycin (loss of pTargetF derivatives) and kanamycin (loss of pCas) was tested to confirm the loss of these plasmids.

Plating efficiency assay. Bacteria were grown to the late exponential phase, *i.e.* to an OD_{600nm} 1.0 to 4.0 (*ca.* 6 h at 37 °C with vigorous shaking). The OD_{600nm} was adjusted to 1.0 and 10-fold dilutions (10⁻¹ to 10⁻⁵) were prepared in BHI broth. Five μ l of the resulting bacterial suspensions were spotted on BHI agar plates supplemented with inducers and drugs as indicated in the legend to figures. For the disk diffusion assay, 5 μ l of the bacterial suspension at an OD_{600nm} of 1.0 was inoculated in 5 ml of water. BHI agar plates were flooded with the latter suspension, excess liquid was removed, and the plates were kept at room temperature for 15 min prior to the addition of

paper disks containing antibiotics. For the chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG) assay, strain BW25113(*ycbB*, *relA'*) harboring pHV30bis(*lacZ*) was used since the parental BW25113 strain do not express the chromosomal copy of *lacZ*. Plates were imaged or the inhibition diameters were measured after 16 h (or 24 h for plates containing ceftriaxone) of incubation at 37 °C. Data shown in the figures are representatives of at least two biological repeats and the inhibition diameters measured are the median of three biological replicates.

Preparation of sacculi. Bacteria were grown in BHI broth to the late exponential phase, *i.e.* to an OD_{600nm} greater than 1.0 (*ca.* 6 h at 37 °C under agitation). Ten μ l of the resulting bacterial suspensions were plated on BHI agar supplemented with inducers (40 μ M IPTG and 1% L-arabinose) and drugs (10 μ g/ml tetracycline and 20 μ g/ml chloramphenicol, or 8 μ g/ml ceftriaxone). For each replicate, 5 BHI agar plates were used in order to obtain a sufficient amount of bacteria. Plates were incubated for 16 h (or 24 h for plates containing ceftriaxone) at 37 °C. Bacteria were harvested in two steps by scrapping each plate with 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2 followed by an additional wash of the plate with 1 ml of PBS. Bacteria were boiled in 0.5 x PBS supplemented with 4% sodium dodecyl sulfate (SDS) in a final volume of 20 ml for 1 h. Sacculi were harvested by centrifugation (20,000 x *g* for 20 min at 20 °C), washed five times with 20 ml of water, resuspended in 1 ml of 20 mM Tris-HCl pH 7.5, and incubated with 100 μ g/ml pronase at 37 °C for 16 h. Sacculi were washed five times with 1 ml of water, resuspended in 1 ml of 20 mM sodium phosphate pH 8.0 and incubated with 100 μ g/ml trypsin at 37 °C for 16 h. Sacculi were washed five times with 1 ml water, boiled for 5 min, collected by centrifugation, resuspended in 300 μ l of water, and stored at -20 °C.

Peptidoglycan analysis. Ten μ l of purified sacculi were digested with 120 μ M lysozyme in 40 mM Tris-HCl pH 8.0 at 37 °C for 16 h. Insoluble material was removed by centrifugation at 12,000 rpm in a microcentrifuge for 10 min and the soluble fraction containing muropeptides was reduced with sodium borohydride in 125 mM borate buffer pH 9.0 for 1 h at room temperature. Phosphoric acid was used to adjust the pH to 4.0. Muropeptides were separated by *rp*HPLC in a C18 column (Hypersil GOLD aQ; 250 x 4.6 mm; 3 μ m, Thermo Scientific) at a flow rate of 1 ml/min with a linear gradient (0 to 20%) applied between 10 and 60 min (buffer A, TFA 0.1%; buffer B, acetonitrile 99.9%, TFA 0.1%, v/v). Absorbance was monitored at 205 nm and fractions were collected, lyophilized, resuspended in water and analyzed by mass spectrometry. Mass spectra were obtained on a Bruker Daltonics maXis high-resolution mass spectrometer (Bremen,

Germany) operating in the positive mode (Analytical Platform of the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France). Mass spectral data were explored using mineXpert2⁵⁵.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the French National Research Agency ANR 'RegOPeps' (grant ANR-19-CE44-0007 to JEH). HV is the recipient of a doctoral fellowship from Sorbonne-Université (ED 515, Complexité du Vivant). We thank A. Marie for technical assistance in the collection of mass spectra at the Plateau Technique de Spectrométrie de Masse Bio-Organique of the Muséum national d'Histoire Naturelle. We thank Z. Edoó and F. Rusconi for critical reading of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

HV: conception and design; acquisition, analysis, and interpretation of data; drafting and revising the article. SK: analysis of data, drafting and revising the article. GS: drafting and revising the article. MA and JEH: conception and design; analysis and interpretation of data; drafting and revising the article.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY SECTION

Tn-seq data are available at the Sequence Read Archive database (link available soon).

REFERENCES

1. Turner, R. D., Vollmer, W. & Foster, S. J. Different walls for rods and balls: the diversity of peptidoglycan. *Mol. Microbiol.* **91**, 862–874 (2014).
2. Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A. & Charlier, P. The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* vol. **32** 234–258 (2008).
3. Banzhaf, M. *et al.* Outer membrane lipoprotein Nlpl scaffolds peptidoglycan hydrolases within multi-enzyme complexes in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **39** (2020).

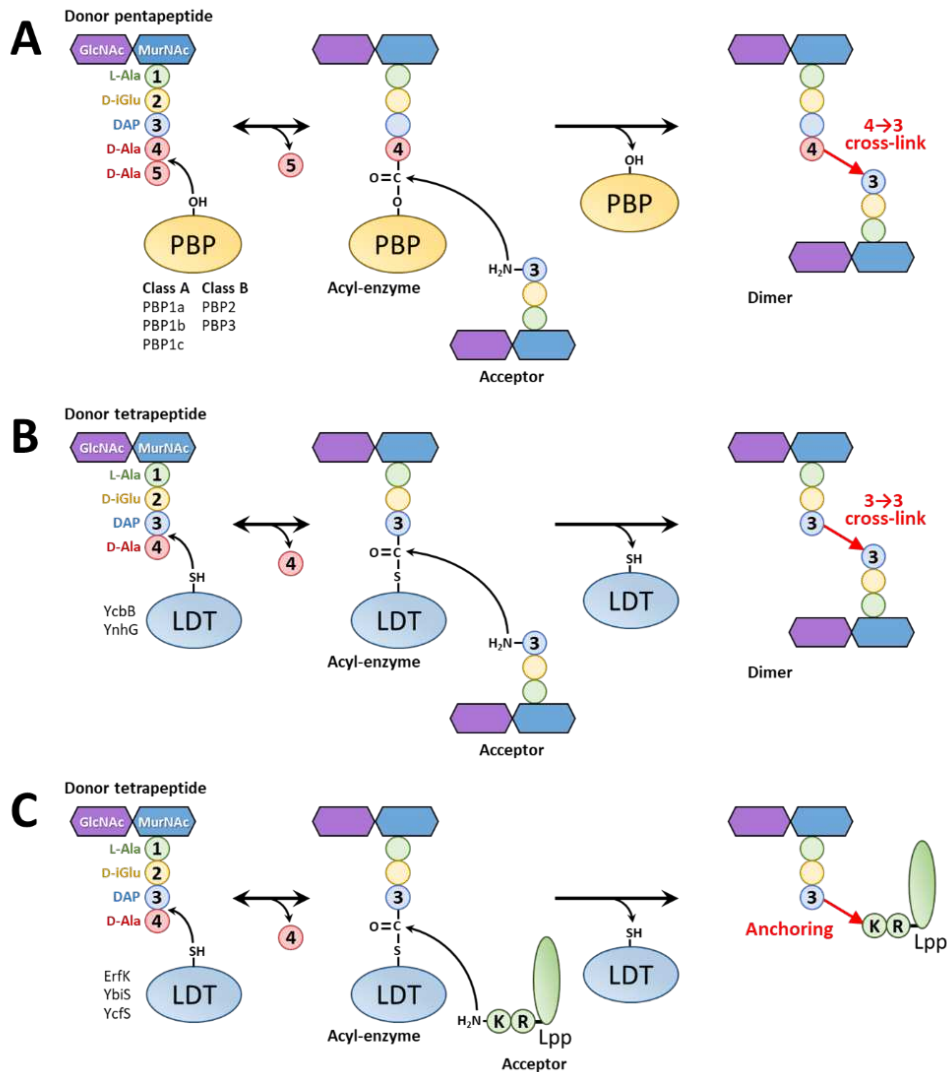
4. Singh, S. K., SaiSree, L., Amrutha, R. N. & Reddy, M. Three redundant murein endopeptidases catalyse an essential cleavage step in peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **86**, 1036–1051 (2012).
5. Vollmer, W. Bacterial growth does require peptidoglycan hydrolases. *Mol. Microbiol.* **86**, 1031–1035 (2012).
6. Egan, A. J. F., Errington, J. & Vollmer, W. Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nature Reviews Microbiology* vol. **18** 446–460 (2020).
7. Voedts, H. *et al.* Role of endopeptidases in peptidoglycan synthesis mediated by alternative cross-linking enzymes in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **40**, e108126 (2021).
8. Hugonnet, J. E. *et al.* Factors essential for L,D-transpeptidase-mediated peptidoglycan cross-linking and β -lactam resistance in *Escherichia coli*. *Elife* **5** (2016).
9. Magnet, S., Dubost, L., Marie, A., Arthur, M. & Gutmann, L. Identification of the L,D-Transpeptidases for Peptidoglycan Cross-Linking in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**, 4782–4785 (2008).
10. Magnet, S. *et al.* Identification of the L,D-transpeptidases responsible for attachment of the Braun lipoprotein to *Escherichia coli* peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **189**, 3927–3931 (2007).
11. Mainardi, J. L., Villet, R., Bugg, T. D., Mayer, C. & Arthur, M. Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* vol. **32** 386–408 (2008).
12. Mainardi, J. L. *et al.* A novel peptidoglycan cross-linking enzyme for a β -lactam-resistant transpeptidation pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 38146–38152 (2005).
13. Lavollay, M. *et al.* The peptidoglycan of stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis* predominantly contains cross-links generated by L,D-transpeptidation. *J. Bacteriol.* **190**, 4360–4366 (2008).
14. Hugonnet, J. E., Tremblay, L. W., Boshoff, H. I., Barry, C. E. & Blanchard, J. S. Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **323**, 1215–1218 (2009).

15. Morè, N. *et al.* Peptidoglycan Remodeling Enables *Escherichia coli* To Survive Severe Outer Membrane Assembly Defect. *MBio* **10** (2019).
16. Izaki, K., Matsushashi, M. & Strominger, J. L. Glycopeptide transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **55**, 656–663 (1966).
17. Hong, Y., Zeng, J., Wang, X., Drlica, K. & Zhao, X. Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 10064–10071 (2019).
18. Lobritz, M. A. *et al.* Increased energy demand from anabolic-catabolic processes drives β -lactam antibiotic lethality. *Cell Chem. Biol.* **29**, 276-286.e4 (2022).
19. Lopatkin, A. J. *et al.* Bacterial metabolic state more accurately predicts antibiotic lethality than growth rate. *Nat. Microbiol.* **2019 412 4**, 2109–2117 (2019).
20. Cho, H., Uehara, T. & Bernhardt, T. G. Beta-Lactam Antibiotics Induce a Lethal Malfunctioning of the Bacterial Cell Wall Synthesis Machinery. *Cell* **159**, 1300–1311 (2014).
21. Bahadur, R., Chodiseti, P. K. & Reddy, M. Cleavage of Braun’s lipoprotein Lpp from the bacterial peptidoglycan by a paralog of L,D-transpeptidases, LdtF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118** (2021).
22. Winkle, M. *et al.* Dpaa detaches Braun’s lipoprotein from peptidoglycan. *MBio* **12** (2021).
23. Van Opijnen, T. & Camilli, A. Transposon insertion sequencing: a new tool for systems-level analysis of microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013 117 11**, 435–442 (2013).
24. Ramm, B., Heermann, T. & Schwille, P. The *E. coli* MinCDE system in the regulation of protein patterns and gradients. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019 7621 76**, 4245–4273 (2019).
25. Stouf, M., Meile, J. C. & Cornet, F. FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 11157–11162 (2013).
26. Samaluru, H., Saisree, L. & Reddy, M. Role of SufI (FtsP) in cell division of *Escherichia coli*: Evidence for its involvement in stabilizing the assembly of the divisome. *J.*

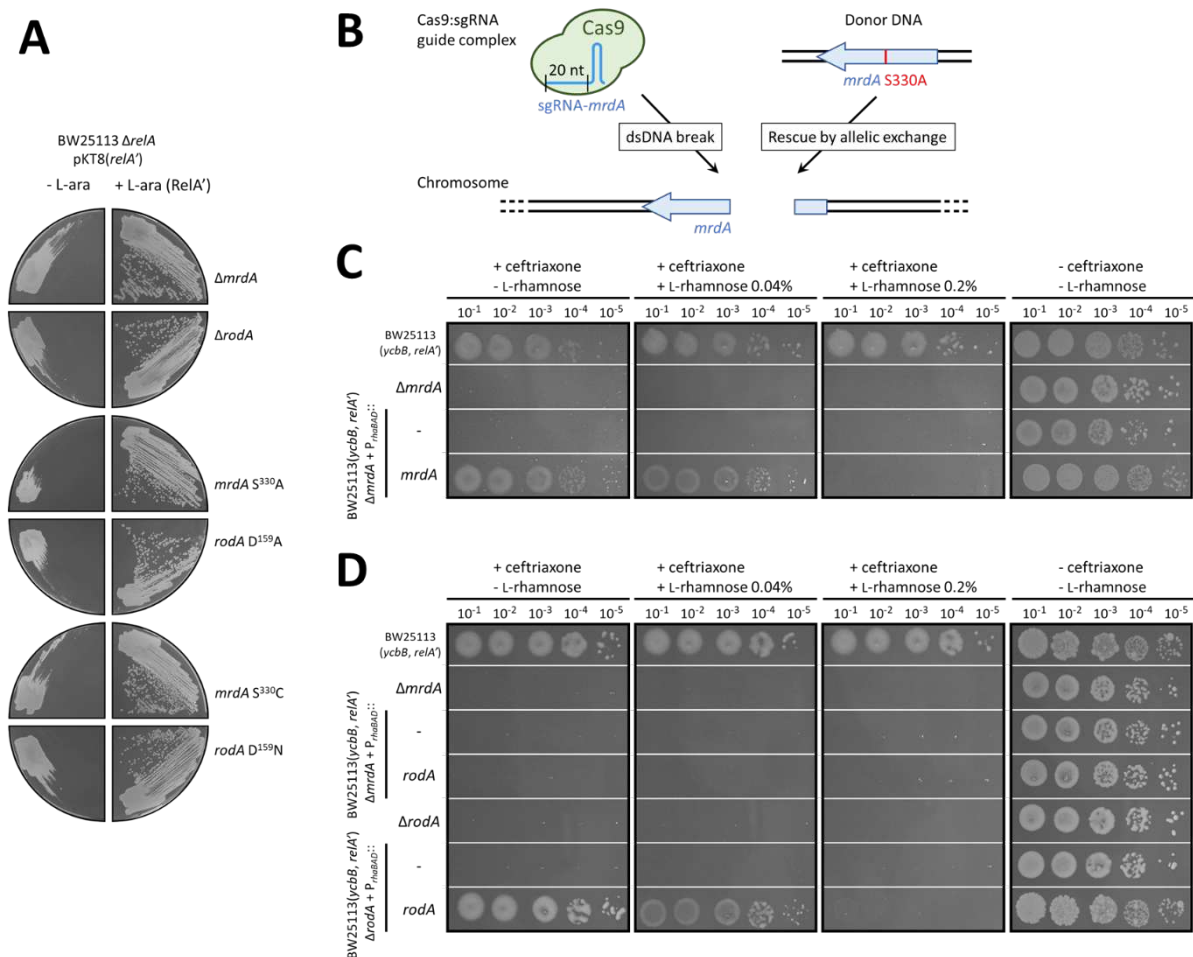
- Bacteriol.* **189**, 8044–8052 (2007).
27. Pichoff, S., Du, S. & Lutkenhaus, J. Disruption of divisome assembly rescued by FtsN–FtsA interaction in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E6855–E6862 (2018).
 28. Truong, T. T., Vettiger, A. & Bernhardt, T. G. Cell division is antagonized by the activity of peptidoglycan endopeptidases that promote cell elongation. *Mol. Microbiol.* **114**, 966–978 (2020).
 29. Szczepaniak, J., Press, C. & Kleanthous, C. The multifarious roles of Tol-Pal in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **44**, 490–506 (2020).
 30. Vinella, D., D’Ari, R. & Boulloc, P. Penicillin binding protein 2 is dispensable in *Escherichia coli* when ppGpp synthesis is induced. *EMBO J.* **11**, 1493–1501 (1992).
 31. Vinella, D., Joseleau-Petit, D., Thevenet, D., Boulloc, P. & D’Ari, R. Penicillin-binding protein 2 inactivation in *Escherichia coli* results in cell division inhibition, which is relieved by FtsZ overexpression. *J. Bacteriol.* **175**, 6704–6710 (1993).
 32. Kocaoglu, O. & Carlson, E. E. Profiling of β -lactam selectivity for penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* strain DC2. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 2785–2790 (2015).
 33. Rohs, P. D. A. *et al.* A central role for PBP2 in the activation of peptidoglycan polymerization by the bacterial cell elongation machinery. *PLOS Genet.* **14**, e1007726 (2018).
 34. Özbaykal, G. *et al.* The transpeptidase PBP2 governs initial localization and activity of the major cell-wall synthesis machinery in *E. coli*. *Elife* **9** (2020).
 35. Liu, X., Biboy, J., Consoli, E., Vollmer, W. & den Blaauwen, T. MreC and MreD balance the interaction between the elongasome proteins PBP2 and RodA. *PLoS Genet.* **16** (2020).
 36. Jacobs, C., Huang, L. J., Bartowsky, E., Normark, S. & Park, J. T. Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *EMBO J.* **13**, 4684–4694 (1994).

37. Johnson, J. W., Fisher, J. F. & Mobashery, S. Bacterial cell-wall recycling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1277**, 54–75 (2013).
38. Mengin-Lecreulx, D., Van Heijenoort, J. & Park, J. T. Identification of the *mpl* gene encoding UDP-N-acetylmuramate: L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase in *Escherichia coli* and its role in recycling of cell wall peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **178**, 5347–5352 (1996).
39. Templin, M. F., Ursinus, A. & Höltje, J. V. A defect in cell wall recycling triggers autolysis during the stationary growth phase of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **18**, 4108–4117 (1999).
40. Mengin-Lecreulx, D., Michaud, C., Richaud, C., Blanot, D. & Van Heijenoort, J. Incorporation of L,L-diaminopimelic acid into peptidoglycan of *Escherichia coli* mutants lacking diaminopimelate epimerase encoded by *dapF*. *J. Bacteriol.* **170**, 2031–2039 (1988).
41. Whitfield, C. Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annual Review of Biochemistry* **75**, 39–68 (2006).
42. Rai, A. K. & Mitchell, A. M. Enterobacterial common antigen: Synthesis and function of an enigmatic molecule. *MBio* **11**, 1–19 (2020).
43. Bertani, B. & Ruiz, N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus* **8** (2018).
44. Dwyer, D. J. *et al.* Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E2100–E2109 (2014).
45. Atze, H. *et al.* Heavy isotope labeling and mass spectrometry reveal unexpected remodeling of bacterial cell wall expansion in response to drugs. *Elife* **11** (2022).
46. Rojas, E. R. *et al.* The outer membrane is an essential load-bearing element in Gram-negative bacteria. *Nature* **559**, 617–621 (2018).
47. Mathelié-Guinlet, M., Asmar, A. T., Collet, J. F. & Dufrêne, Y. F. Lipoprotein Lpp regulates the mechanical properties of the *E. coli* cell envelope. *Nat. Commun.* **11**, 1–11 (2020).

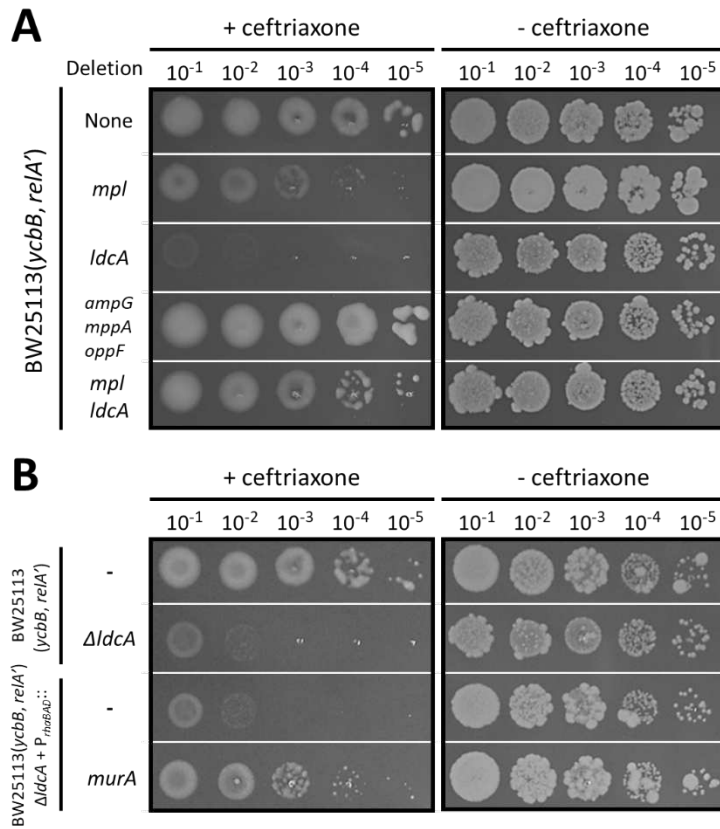
48. May, K. L. & Grabowicz, M. The bacterial outer membrane is an evolving antibiotic barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 8852–8854 (2018).
49. Paradis-Bleau, C., Kritikos, G., Orlova, K., Typas, A. & Bernhardt, T. G. A Genome-Wide Screen for Bacterial Envelope Biogenesis Mutants Identifies a Novel Factor Involved in Cell Wall Precursor Metabolism. *PLOS Genet.* **10**, e1004056 (2014).
50. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6640–6645 (2000).
51. Baba, T. *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2** (2006).
52. DeJesus, M. A., Ambadipudi, C., Baker, R., Sasseti, C. & Ioerger, T. R. TRANSIT - A Software Tool for *Himar1* TnSeq Analysis. *PLOS Comput. Biol.* **11**, e1004401 (2015).
53. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **26**, 589–595 (2010).
54. Jiang, Y. *et al.* Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 2506–2514 (2015).
55. Langella, O. & Rusconi, F. mineXpert2: Full-Depth Visualization and Exploration of MSⁿ Mass Spectrometry Data. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **32**, 1138–1141 (2021).



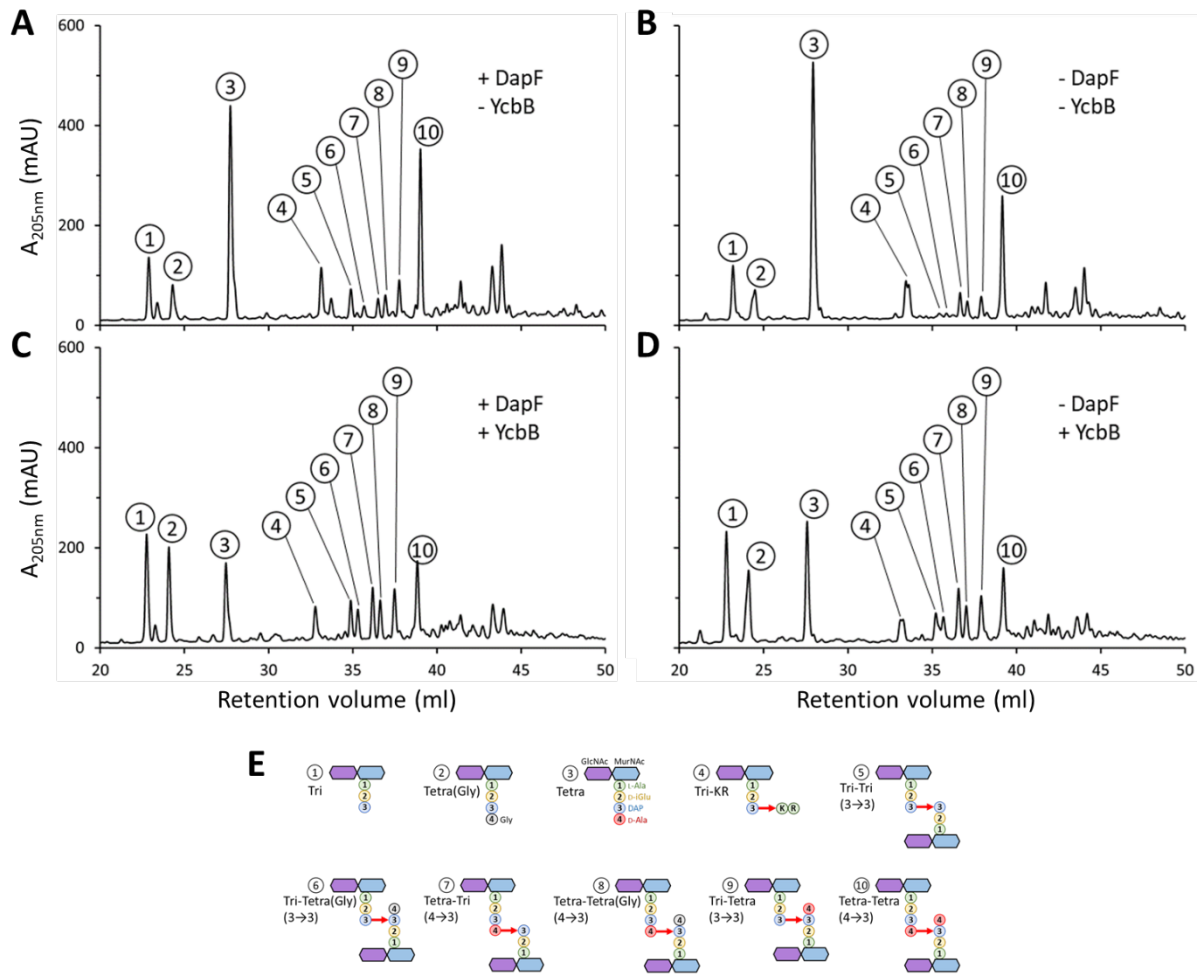
Supplementary Figure S1. Reactions catalyzed by PBPs and L,D-transpeptidases. (A) Nucleophilic attack of the carbonyl of D-Ala⁴ in a pentapeptide donor stem by the catalytic Ser residue of the D,D-transpeptidase results in the release of D-Ala⁵ and formation of an acyl-enzyme. In the following step, nucleophilic attack of the carbonyl of the ester bond by the side-chain amino group of the diaminopimelyl (DAP) residue of an acceptor leads to the release of the PBP and to the formation of a peptidoglycan dimer. The corresponding cross-link is referred to as 4→3 as it connects D-Ala at the 4th position of the donor to DAP at the 3rd position of the acceptor. The acceptor stem is a tripeptide or a tetrapeptide resulting in the formation of Tetra→Tri and Tetra→Tetra dimers, respectively. The 4→3 cross-links are potentially formed by three Class A PBPs (PBP1a, PBP1b, PBP1c), which contain glycosyltransferase and D,D-transpeptidase domains, and by two catalytically mono-functional Class B PBPs (PBP2 and PBP3). (B) Nucleophilic attack of the carbonyl of DAP³ in a tetrapeptide donor stem by the catalytic Cys residue of L,D-transpeptidases YcbB and YnhG results in the release of D-Ala⁴ and in the formation of an acyl-enzyme. In the following step, nucleophilic attack of the thioester by the DAP residue of the acceptor stem leads to the release of the L,D-transpeptidases and to the formation of 3→3 cross-links connecting two DAP residues. (C) L,D-transpeptidases ErfK, YbiS, and YcfS anchor the Braun lipoprotein (Lpp) to the peptidoglycan by connecting the 3rd position of a peptidoglycan donor stem to the C-terminal Lys residue of Lpp. The first step involves formation of the acyl-enzyme already described in panel B (for the reaction catalyzed by YcbB and YnhG). In the second step, the thioester bond is attacked by the side-chain amino group of the Lys residue leading to the formation of a Tri→Lpp linkage. For peptidoglycan analysis, treatment of sacculi with trypsin and muramidases leads to the release of a disaccharide-tripeptide substituted by the Lys-Arg residue from the lipoprotein (Tri→KR).



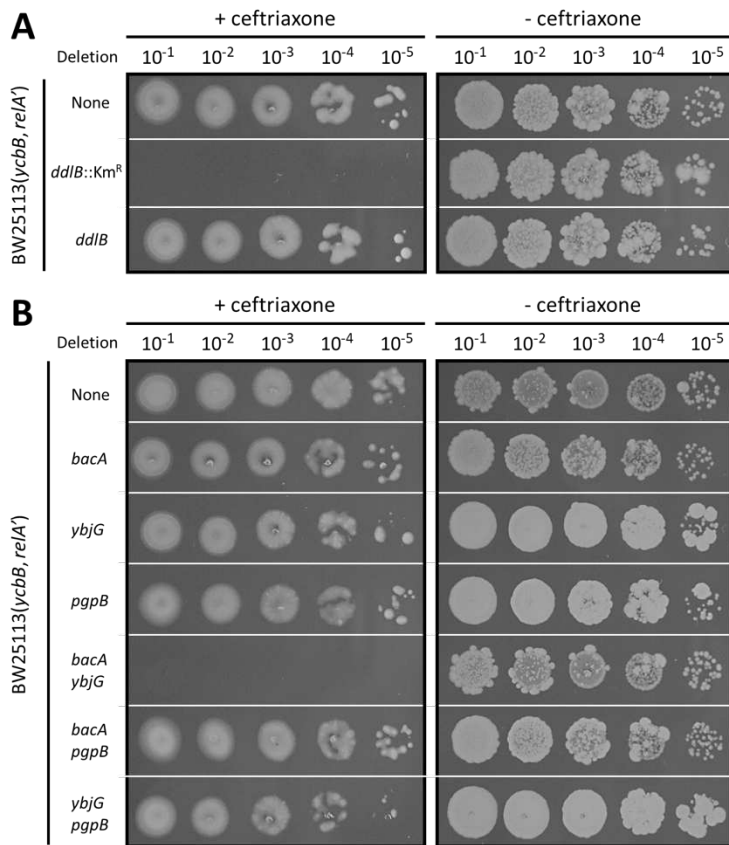
Supplementary Figure 2. Exploring the essentiality of PBP2 and RodA by the CRISPR approach. (A) (p)ppGpp dependence of derivatives of BW25113 $\Delta relA$ pKT8(*relA'*) harboring mutations in the *mrDA* and *rodA* genes encoding glycosyltransferase RodA and class B PBP PBP2, respectively. The BHI agar plates contained 1% L-arabinose (+L-ara) for induction of *relA'* or no inducer (-L-ara). This analysis showed that growth of *mrDA* and *rodA* mutants is dependent on the expression of the *relA'* (p)ppGpp synthase gene. **(B)** Schematic representation of the approach used to introduce in one step in-frame deletions or point mutations in chromosomal genes encoding PBP2 and RodA. **(C)** Complementation of chromosomal $\Delta mrDA$ deletion by the expression of the *mrDA* gene expressed under the control of the *P_{rhaBAD}* promoter of expression vector pHV30. Bacterial growth was tested in the presence of ceftriaxone at 8 μ g/ml (+ ceftriaxone) or in the absence of the drug (- ceftriaxone) on BHI agar plates supplemented with 40 μ M IPTG and 1% L-arabinose for induction of *ycbB* and *relA'*, respectively. Basal level of expression of *mrDA* in the absence of L-rhamnose was sufficient for complementation. Stronger level of expression of *mrDA* with 0.2% L-rhamnose was toxic. **(D)** Complementation of chromosomal $\Delta mrDA$ and $\Delta rodA$ deletions by the expression of the *rodA* gene expressed under the control of the *P_{rhaBAD}* promoter of expression vector pHV30. Basal level of expression of *rodA* in the absence of L-rhamnose was sufficient for complementation of the *rodA* deletion only. Stronger level of expression of *rodA* with 0.2% L-rhamnose was toxic. These analyses ruled out the possibility that the phenotype associated with the deletion of *mrDA* resulted from a polar effect on the expression of the *rodA* gene.



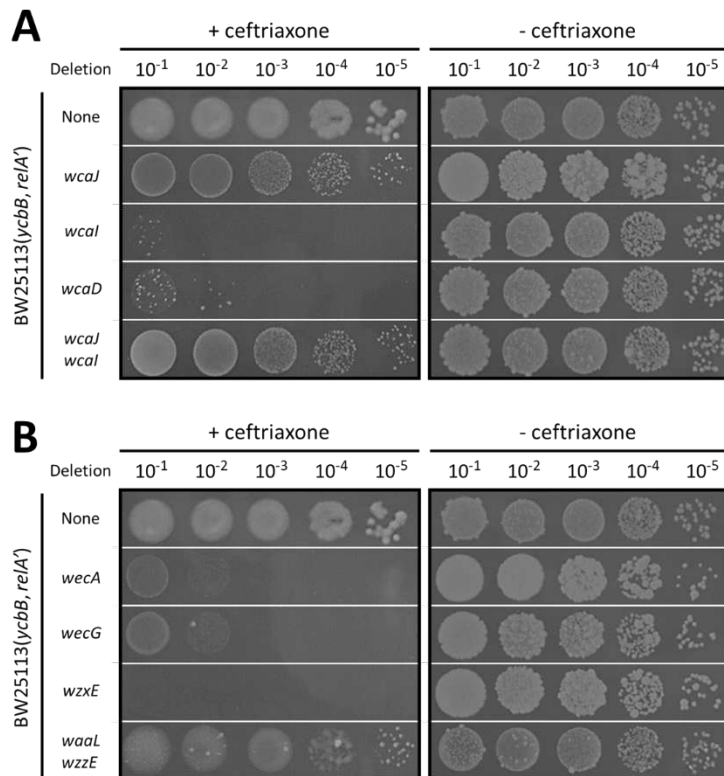
Supplementary Figure S3. Exploring the essentiality of peptidoglycan recycling. (A) Bacterial growth was tested in the presence of ceftriaxone at 8 μ g/ml (+ ceftriaxone) or in the absence of the drug (- ceftriaxone) on BHI agar plates supplemented with 40 μ M IPTG and 1% L-arabinose for induction of *ycbB* and *relA'*, respectively. The triple Δ *ampG*, Δ *mppA*, and Δ *oppF* mutant was deficient in the two permeases for the import of peptidoglycan fragments. In spite of the unessential nature of peptidoglycan recycling, deletion of *ldcA* was not compatible with growth in the presence of ceftriaxone. Resistance of the Δ *ldcA* mutant was restored by the additional deletion of *mpl* encoding the enzyme that ligates tripeptide L-Ala-D-iGlu-DAP and tetrapeptide L-Ala-D-iGlu-DAP-D-Ala onto UDP-MurNAc. Thus, production of UDP-MurNAc-tetrapeptide was responsible for the drug susceptibility of the Δ *ldcA* single mutant. (B) Overexpression of the *murA* gene compensated for the inactivation of *ldcA*. The *murA* gene was expressed under the control of the P_{*rhaBAD*} promoter of vector pHV30 in the presence of 0.2% L-rhamnose.



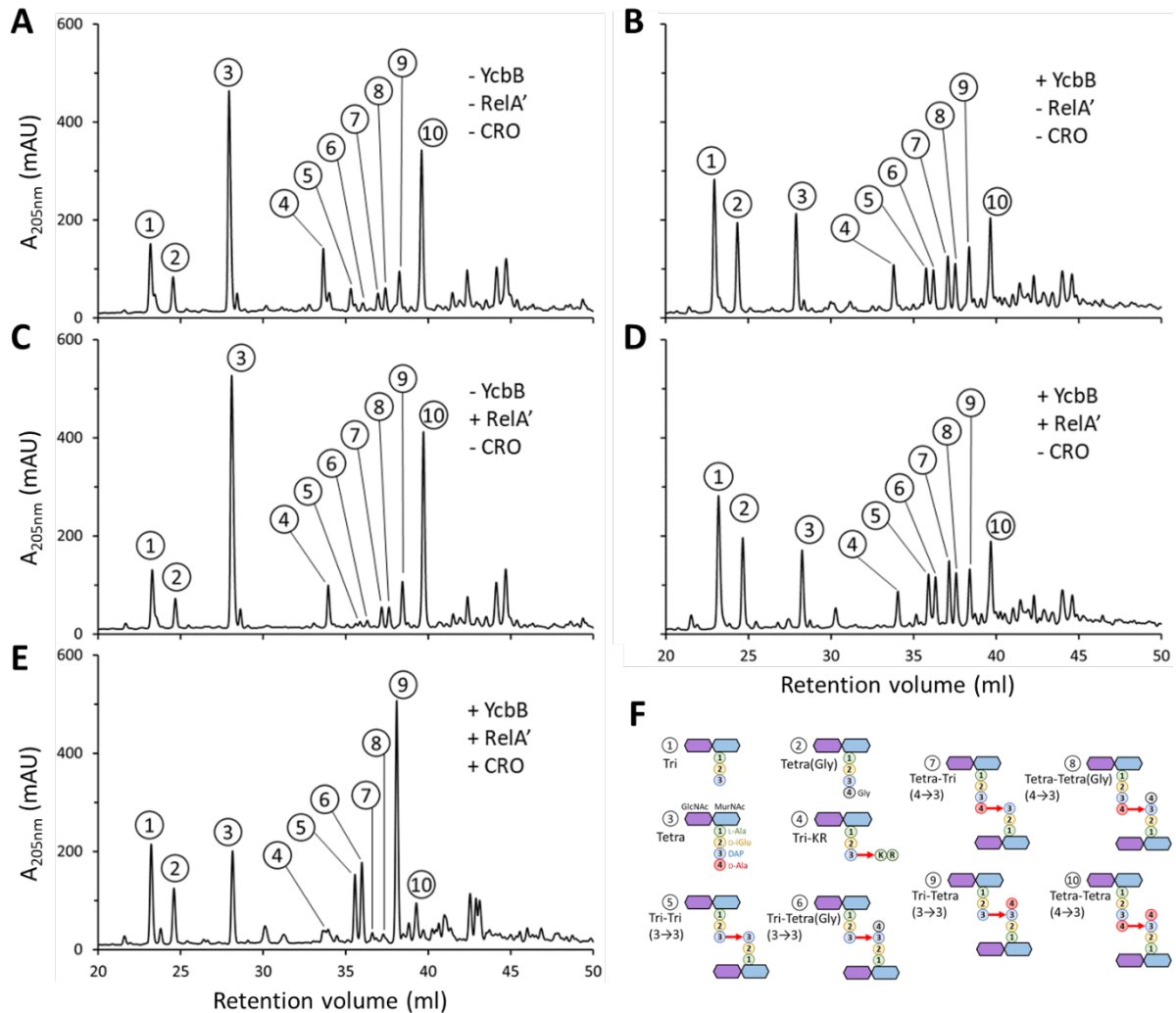
Supplementary Figure S4. Replacement of *meso*DAP by L,L-DAP is compatible with formation of 3→3 cross-links and with the anchoring of the Braun lipoprotein. Peptidoglycan was extracted, digested by muramidases, and the resulting muropeptides were separated by *rp*HPLC (mAU, milli-absorbance unit, $\lambda=205$ nm). The structure of muropeptides in *rp*HPLC peaks 1 to 10 was identified by mass spectrometry. **(A and B)** Peptidoglycan was extracted from BW25113 Δ *relA* harboring vector pHV6 (+DapF -YcbB) and its derivative obtained by deletion of *dapF* (-DapF -YcbB) respectively. **(C and D)** Peptidoglycan was extracted from BW25113 Δ *relA* harboring plasmid pKT2(*ycbB*) (+DapF +YcbB) and its derivative obtained by deletion of the *dapF* gene (-DapF +YcbB), respectively. Bacteria were grown in the presence of tetracycline [to counter select loss of pHV6 and pKT2(*ycbB*)] and 40 μ M IPTG (for induction of *ycbB*). **(E)** Structure of muropeptides. Tetra, tetrapeptide L-Ala-D-iGlu-DAP-D-Ala; Tri, tripeptide L-Ala-D-iGlu-DAP; Tri-KR, tripeptide L-Ala-D-iGlu-DAP containing the dipeptide Lys-Arg originating from the Braun lipoprotein; Tri-Tri and Tri-Tetra, dimers containing a tripeptide donor stem linked to a tripeptide or tetrapeptide acceptor, respectively. These dimers contained a 3→3 cross-link formed by the YcbB L,D-transpeptidase. Tetra-Tri and Tetra-Tetra, dimers containing a tetrapeptide donor linked to a tripeptide or tetrapeptide acceptor, respectively. These dimers contained a 4→3 cross-link formed by the D,D-transpeptidases belonging to the PBP family; Tetra(Gly), Tri-Tetra(Gly), and Tetra-Tetra(Gly), muropeptides containing a Gly residue instead of D-Ala at the 4th position of the free stem. These muropeptides originated from the exchange of D-Ala by Gly catalyzed by L,D-transpeptidases. Data are representative chromatograms from three biological repeats.



Supplementary Figure S5. Essentiality of genes encoding redundant peptidoglycan biosynthesis enzymes. (A) Testing the essentiality of *ddlB* in strain BW25113(*ycbB*, *relA'*) encoding one of the two D-Ala-D-Ala ligases. Growth was tested in the presence of ceftriaxone at 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (+ ceftriaxone) or in the absence of the drug (- ceftriaxone) on BHI agar plates supplemented with 40 μM IPTG and 1% L-arabinose for induction of *ycbB* and *relA'*, respectively. The presence of the Km^{R} cassette abolished ceftriaxone resistance. Removing the Km^{R} cassette from the *ddlB* deletion restored ceftriaxone resistance, indicating that *ddlB* is not required for ceftriaxone resistance and that its essentiality detected in the Tn-seq likely results from a polar effect on the downstream *ftsQAZ* and *lpxC* genes. **(B)** Testing the essentiality and redundancy of C₅₅-PP phosphatase encoding genes in strain BW25113(*ycbB*, *relA'*). Growth was tested in the presence of ceftriaxone at 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (+ ceftriaxone) or in the absence of the drug (- ceftriaxone) on BHI agar plates supplemented with 40 μM IPTG and 1% L-arabinose for induction of *ycbB* and *relA'*, respectively. The derivative strain harboring the double deletion of *bacA* and *ybjG* was susceptible to ceftriaxone, indicating that PgpB alone cannot support growth in the presence of the drug.



Supplementary Figure S6. Essentiality of genes encoding enzymes for colanic acid (A) and ECA (B) synthesis. Growth was tested in the presence of ceftriaxone at 8 $\mu\text{g/ml}$ (+ ceftriaxone) or in the absence of the drug (- ceftriaxone) on BHI agar plates supplemented with 40 μM IPTG and 1% L-arabinose for induction of *ycbB* and *relA'*, respectively.



Supplementary Figure S7. Impact of ceftriaxone on the anchoring of the Braun lipoprotein to peptidoglycan. Peptidoglycan was extracted, digested by muramidases, and the resulting muropeptides were separated by *rp*HPLC (mAU, milli-absorbance unit, $\lambda=205$ nm). Peptidoglycan was extracted from derivatives of strains BW25113 Δ *relA* harboring vectors pHV6 and pHV7 (**A**), vector pHV7 and plasmid pKT2(*ycbB*) (**B**), vector pHV6 and plasmid pKT8(*relA'*) (**C**), and plasmids pKT2(*ycbB*) and pKT8(*relA'*) (**D** and **E** for growth in the absence or presence of ceftriaxone, respectively). The growth medium contained tetracycline (to counter select loss of pHV6 and pKT2), chloramphenicol (to counter select loss of pHV7 and pKT8), except for BW25113 Δ *relA* pKT2(*ycbB*) pKT8(*relA'*) grown in the presence of ceftriaxone (as this drug counter select loss of both plasmids). All cultures contained 40 μ M IPTG for induction of the P_{trc} promoter of pHV6 and pKT2(*ycbB*) and 1% L-arabinose for induction of the P_{araBAD} promoter of pHV7 and pKT8(*relA'*). The Tri-KR muropeptide (peak 4) was present in all chromatograms but with a much lower abundance for BW25113 Δ *relA* pKT2(*ycbB*) pKT8(*relA'*) grown in the presence of ceftriaxone indicating that this drug prevents the anchoring of the Braun lipoprotein to peptidoglycan. (**F**) Structure of the muropeptides deduced from mass spectrometry analyses. Data are representative chromatograms from three biological repeats.

Table S1. Characteristics and origin of the strains, plasmids and oligonucleotides used in this study

Strain	Characteristics	Origin
BW25113	$\Delta(araD-araB)567 \Delta(rhaD-rhaB)568$ $\Delta lacZ4787 (::rrnB-3) hsdR514 rph-1$	Baba, T. <i>et al</i> ⁶¹
BW25513(<i>ycbB</i> , <i>relA'</i>)	$\Delta relA$ derivative of BW25113 harboring pKT2(<i>ycbB</i>) and pKT8(<i>relA'</i>) plasmids	Hugonnet, J. E. <i>et al</i> ⁸
Plasmid	Characteristics	Origin
<i>Vectors</i>		
pHV6	Tet ^R P _{trc} <i>lacI</i> <i>oriV</i> CloDF13	Voedts, H. <i>et al</i> ⁷
pHV7	Cm ^R P _{araBAD} <i>araC</i> <i>oriV</i> p15A	Voedts, H. <i>et al</i> ⁷
pHV30	Zeo ^R P _{rhaBAD} <i>rhaSR</i> <i>oriV</i> pSC101	Voedts, H. <i>et al</i> ⁷
<i>Recombinant plasmids for ycbB and relA' expression</i>		
pKT2	pHV6 Ω <i>ycbB</i>	Hugonnet, J. E. <i>et al</i> ⁸
pKT8	pHV7 Ω <i>relA'</i>	Hugonnet, J. E. <i>et al</i> ⁸
<i>Recombinant plasmids for complementation of rodA and ldcA gene deletions</i>		
pHV112	pHV30 Ω <i>murA</i>	This study
pHV113	pHV30 Ω <i>rodA</i>	This study
pHV131	pHV30 Ω <i>mrda</i>	This study
<i>Recombinant plasmids for CRISPR-Cas9 mutagenesis</i>		
pCas	Km ^R P _{araBAD} λ Red <i>araC</i> <i>cas9</i> P _{trc} <i>sgRNA</i> -pMB1 <i>lacI</i> <i>oriV</i> pSC101 ^{ts}	Jiang, Y. <i>et al</i> ⁶⁴
pTargetF	Sm ^R <i>sgRNA</i> <i>oriV</i> pMB1	Jiang, Y. <i>et al</i> ⁶⁴
pTargetF- <i>mrda</i>	Sm ^R <i>sgRNA</i> - <i>mrda</i> <i>oriV</i> pMB1	This study
pTargetF- <i>rodA</i>	Sm ^R <i>sgRNA</i> - <i>rodA</i> <i>oriV</i> pMB1	This study
Oligonucleotide	Sequence (5'→3')	
<i>Junction fragment amplification</i>		
HV1	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATNNNNNNGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT CCGATCTGAGACACAATTCATCGATGATG	
HV2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATNNNNNNGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT CCGATCTGACCTGCAGGCATGCAAGC	
<i>pTargetF-mrda/rodA construction</i>		
HV3	AAACCCTATGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	
HV4	AACTGTAGACACTAGTATTATACCTAGGAC	
HV5	CAGCCTGACCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	
HV6	TGCAGCCACCCTAGTATTATACCTAGGAC	
<i>mrda S330A/C donor DNA amplification</i>		
HV7	ATGAAACTACAGAACTCTTTTCG	
HV8	TTAATGGTCTCCGCTGCGG	
<i>rodA D159A/N donor DNA amplification</i>		
HV9	ATGACGGATAATCCGAATAAAAAAAC	
HV10	TTACACGCTTTTCGACAACATTTTC	
<i>Δmrda donor DNA amplification</i>		
HV11	GTTCGCGTGCTGGTCGCAG	
HV12	ATAACCAGGGCGCTGTAAACC	
<i>ΔrodA donor DNA amplification</i>		
HV13	CCTCGACCACATTATGCTGGG	
HV14	TTGTACATGCCGCGAGCATTC	

Supplementary Data file 1B

#CDS (n = 179)	Gene	Description	p-value	Fold-change
Cell envelope (n = 71)				
Peptidoglycan synthesis (n = 20)				
BW25113_0081	<i>mraZ</i>	RsmH methyltransferase inhibitor	0,00037	0,01
BW25113_0092	<i>ddlB</i>	D-alanine:D-alanine ligase	0,00172	0,06
BW25113_0149	<i>mrcB</i>	fused glycosyl transferase and transpeptidase	0,00001	0,01
BW25113_0632	<i>dacA</i>	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (penicillin-binding protein 5)	0,00000	0,00
BW25113_0634	<i>mrdB</i>	cell wall shape-determining protein	0,00074	0,10
BW25113_0635	<i>mrDA</i>	transpeptidase involved in peptidoglycan synthesis (penicillin-binding prot	0,00005	0,03
BW25113_1097	<i>yceG</i>	septation protein%2C ampicillin sensitivity	0,03536	0,00
BW25113_1105	<i>lpoB</i>	OM lipoprotein stimulator of MrcB transpeptidase	0,00188	0,00
BW25113_1175	<i>minD</i>	membrane ATPase of the MinC-MinD-MinE system	0,00002	0,01
BW25113_1176	<i>minC</i>	cell division inhibitor	0,00313	0,02
BW25113_1192	<i>ldcA</i>	murein tetrapeptide carboxypeptidase%3B LD-carboxypeptidase A	0,00377	0,02
BW25113_1254	<i>yciB</i>	LspA family inner membrane protein	0,00007	0,15
BW25113_1856	<i>mepM</i>	murein DD-endopeptidase%2C space-maker hydrolase%2C septation prot	0,00032	0,02
BW25113_2593	<i>yfiH</i>	UPF0124 family protein	0,00006	0,04
BW25113_2742	<i>nlpD</i>	activator of AmiC murein hydrolase activity%2C lipoprotein	0,00035	0,04
BW25113_2817	<i>amiC</i>	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	0,00007	0,20
BW25113_3017	<i>ftsP</i>	septal ring component that protects the divisome from stress%3B multico	0,00205	0,06
BW25113_3250	<i>mreC</i>	cell wall structural complex MreBCD transmembrane component MreC	0,00321	0,01
BW25113_3251	<i>mreB</i>	cell wall structural complex MreBCD%2C actin-like component MreB	0,00005	0,00
BW25113_3809	<i>dapF</i>	diaminopimelate epimerase	0,00136	0,02
Membrane proteins (n = 10)				
BW25113_0217	<i>yafT</i>	lipoprotein	0,00362	0,23
BW25113_0738	<i>tolR</i>	membrane spanning protein in TolA-TolQ-TolR complex	0,00108	0,06
BW25113_0739	<i>tolA</i>	membrane anchored protein in TolA-TolQ-TolR complex	0,00427	0,02
BW25113_0740	<i>tolB</i>	periplasmic protein	0,01875	0,07
BW25113_0741	<i>pal</i>	peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein	0,00364	0,01
BW25113_0957	<i>ompA</i>	outer membrane protein A (3a%3BII*%3BG%3Bd)	0,00026	0,10
BW25113_2111	<i>yehD</i>	putative fimbrial-like adhesin protein	0,00066	0,11
BW25113_2215	<i>ompC</i>	outer membrane porin protein C	0,00110	0,11
BW25113_2512	<i>bamB</i>	BamABCDE complex OM biogenesis lipoprotein	0,00018	0,07
BW25113_4557	<i>yidD</i>	membrane protein insertion efficiency factor%2C inner membrane protei	0,00011	0,05
Outer membrane polymers (n = 37)				
BW25113_0200	<i>gmhB</i>	D%2CD-heptose 1%2C7-bisphosphate phosphatase	0,00000	0,00
BW25113_0222	<i>gmhA</i>	D-sedoheptulose 7-phosphate isomerase	0,01986	0,04
BW25113_3052	<i>hldE</i>	fused heptose 7-phosphate kinase/heptose 1-phosphate adenyltransferas	0,00026	0,04
BW25113_3386	<i>rpe</i>	D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase	0,00838	0,13
BW25113_3619	<i>hldD</i>	ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epimerase%2C NAD(P)-binding	0,00023	0,03
BW25113_3620	<i>waaf</i>	ADP-heptose:LPS heptosyltransferase II	0,00772	0,05
BW25113_3621	<i>waac</i>	ADP-heptose:LPS heptosyl transferase I	0,00000	0,00
BW25113_3630	<i>waap</i>	kinase that phosphorylates core heptose of lipopolysaccharide	0,00001	0,01
BW25113_3631	<i>waag</i>	glucosyltransferase I	0,00008	0,04
BW25113_3786	<i>wecB</i>	UDP-N-acetyl glucosamine-2-epimerase	0,00243	0,08
BW25113_3787	<i>wecC</i>	UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronic acid dehydrogenase	0,00022	0,03
BW25113_3790	<i>wecD</i>	TDP-fucosamine acetyltransferase	0,03831	0,12
BW25113_3791	<i>wecE</i>	TDP-4-oxo-6-deoxy-D-glucose transaminase	0,00121	0,01
BW25113_3792	<i>wzxE</i>	O-antigen translocase	0,00549	0,05
BW25113_3794	<i>wecG</i>	UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronic acid transferase	0,00246	0,19
BW25113_4481	<i>wecF</i>	TDP-Fuc4NAc:lipidIIIFuc4NAc transferase	0,01240	0,06
BW25113_1613	<i>manA</i>	mannose-6-phosphate isomerase	0,00012	0,00
BW25113_2028	<i>ugd</i>	UDP-glucose 6-dehydrogenase	0,00002	0,00
BW25113_2043	<i>wcaM</i>	colanic acid biosynthesis protein	0,00002	0,15
BW25113_2044	<i>wcaL</i>	putative glycosyl transferase	0,00020	0,06
BW25113_2045	<i>wcaK</i>	colanic acid biosynthesis protein	0,00388	0,00
BW25113_2046	<i>wzxC</i>	putative colanic acid exporter	0,00008	0,01
BW25113_2048	<i>cpsG</i>	phosphomannomutase	0,00005	0,04
BW25113_2049	<i>cpsB</i>	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	0,00202	0,23
BW25113_2050	<i>wcaI</i>	putative glycosyl transferase	0,00166	0,01
BW25113_2052	<i>wcaG</i>	bifunctional GDP-fucose synthetase: GDP-4-dehydro-6-deoxy-D-mannose	0,00388	0,11
BW25113_2053	<i>gmd</i>	GDP-D-mannose dehydratase%2C NAD(P)-binding	0,00001	0,04

BW25113_2054	<i>wcaF</i>	putative acyl transferase	0,00002	0,02
BW25113_2055	<i>wcaE</i>	putative glycosyl transferase	0,00022	0,01
BW25113_2056	<i>wcaD</i>	putative colanic acid polymerase	0,00000	0,04
BW25113_2057	<i>wcaC</i>	putative glycosyl transferase	0,00049	0,02
BW25113_2059	<i>wcaA</i>	putative glycosyl transferase	0,01225	0,00
BW25113_2060	<i>wzc</i>	colanic acid production tyrosine-protein kinase%3B autokinase%3B Ugd pl	0,00014	0,01
BW25113_2061	<i>wzb</i>	colanic acid production protein-tyrosine-phosphatase%3B Wzc-P dephosp	0,00028	0,12
BW25113_2062	<i>wza</i>	colanic acid export protein%3B outer membrane auxillary lipoprotein	0,00000	0,03
BW25113_0759	<i>galE</i>	UDP-galactose-4-epimerase	0,00046	0,00
BW25113_3205	<i>yhbJ</i>	adaptor protein RapZ for GlmZ/GlmY sRNA decay%3B glucosamine-6-phos	0,00125	0,12
Lipid synthesis (n = 4)				
BW25113_3192	<i>mlaC</i>	ABC transporter maintaining OM lipid asymmetry%2C periplasmic binding	0,00026	0,08
BW25113_3195	<i>mfaF</i>	ABC transporter maintaining OM lipid asymmetry%2C ATP-binding proteir	0,00001	0,20
BW25113_4042	<i>dgkA</i>	diacylglycerol kinase	0,00387	0,16
BW25113_4472	<i>yhdP</i>	DUF3971-AsmA2 domains protein	0,00053	0,00
Stress response (n = 35)				
BW25113_0303	<i>rclB</i>	reactive chlorine species (RCS) stress resistance periplasmic protein	0,00049	0,08
BW25113_0585	<i>fes</i>	enterobactin/ferric enterobactin esterase	0,00049	0,21
BW25113_0888	<i>trxB</i>	thioredoxin reductase%2C FAD/NAD(P)-binding	0,00039	0,09
BW25113_1352	<i>kilR</i>	Rac prophage%3B inhibitor of ftsZ%2C killing protein	0,01360	0,01
BW25113_2501	<i>ppk</i>	polyphosphate kinase%2C component of RNA degradosome	0,00008	0,03
BW25113_2743	<i>pcm</i>	L-isoaspartate protein carboxylmethyltransferase type II	0,00205	0,07
BW25113_4172	<i>hfq</i>	global sRNA chaperone%3B HF-1%2C host factor for RNA phage Q beta rep	0,00001	0,04
BW25113_0028	<i>fkpB</i>	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase)	0,01412	0,22
BW25113_0053	<i>surA</i>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase)	0,00000	0,00
BW25113_0161	<i>degP</i>	serine endoprotease (protease Do)%2C membrane-associated	0,00000	0,03
BW25113_0178	<i>skp</i>	periplasmic chaperone	0,00027	0,09
BW25113_0407	<i>yajC</i>	SecYEG protein translocase auxillary subunit	0,00607	0,02
BW25113_0436	<i>tig</i>	peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (trigger factor)	0,00000	0,07
BW25113_0441	<i>ppiD</i>	periplasmic folding chaperone%2C has an inactive PPIase domain	0,00046	0,24
BW25113_0492	<i>ybbN</i>	DnaK co-chaperone%2C thioredoxin-like protein	0,00181	0,24
BW25113_2494	<i>bepA</i>	periplasmic metalloprotease and chaperone for OM protein maintenance	0,00017	0,20
BW25113_2526	<i>hscA</i>	DnaK-like molecular chaperone specific for IscU	0,00005	0,04
BW25113_2527	<i>hscB</i>	HscA co-chaperone%2C J domain-containing protein Hsc56%3B IscU-speci	0,00399	0,22
BW25113_2528	<i>iscA</i>	FeS cluster assembly protein	0,04254	0,14
BW25113_2529	<i>iscU</i>	iron-sulfur cluster assembly scaffold protein	0,00154	0,03
BW25113_0143	<i>pcnB</i>	poly(A) polymerase	0,00001	0,00
BW25113_0183	<i>rnhB</i>	ribonuclease HII%2C degrades RNA of DNA-RNA hybrids	0,00004	0,20
BW25113_2567	<i>rnc</i>	RNase III	0,00474	0,17
BW25113_0467	<i>priC</i>	primosomal replication protein N''	0,00058	0,17
BW25113_0799	<i>dinG</i>	ATP-dependent DNA helicase	0,00001	0,03
BW25113_1114	<i>mfd</i>	transcription-repair coupling factor	0,00000	0,01
BW25113_1347	<i>rcbA</i>	double-strand break reduction protein%2C Rac prophage	0,02246	0,01
BW25113_1860	<i>ruvB</i>	ATP-dependent DNA helicase%2C component of RuvABC resolvasome	0,00071	0,17
BW25113_1861	<i>ruvA</i>	component of RuvABC resolvasome%2C regulatory subunit	0,00158	0,18
BW25113_2496	<i>hda</i>	ATPase regulatory factor involved in DnaA inactivation	0,00098	0,05
BW25113_3387	<i>dam</i>	DNA adenine methyltransferase	0,00002	0,00
BW25113_3811	<i>xerC</i>	site-specific tyrosine recombinase	0,00306	0,13
BW25113_3935	<i>priA</i>	Primosome factor n' (replication factor Y)	0,00007	0,01
BW25113_4362	<i>dnaT</i>	DNA biosynthesis protein (primosomal protein I)	0,02552	0,02
BW25113_0637	<i>rsfS</i>	ribosomal silencing factor	0,00265	0,01
Central carbon metabolism (n = 12)				
BW25113_0116	<i>lpd</i>	lipoamide dehydrogenase%2C E3 component is part of three enzyme com	0,00214	0,04
BW25113_0428	<i>cyoE</i>	protoheme IX farnesyltransferase	0,01119	0,14
BW25113_0430	<i>cyoC</i>	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	0,00151	0,11
BW25113_0431	<i>cyoB</i>	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	0,00014	0,06
BW25113_0432	<i>cyoA</i>	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	0,00005	0,23
BW25113_0630	<i>lipB</i>	octanoyltransferase%3B octanoyl-[ACP]:protein N-octanoyltransferase	0,00116	0,11
BW25113_0726	<i>sucA</i>	2-oxoglutarate decarboxylase%2C thiamine triphosphate-binding	0,00007	0,04
BW25113_0727	<i>sucB</i>	dihydrolipoyltranssuccinase	0,04637	0,01
BW25113_1676	<i>pykF</i>	pyruvate kinase I	0,00775	0,13
BW25113_1850	<i>eda</i>	multifunctional 2-keto-3-deoxygluconate 6-phosphate aldolase and 2-ket	0,02477	0,20
BW25113_3600	<i>mtlD</i>	mannitol-1-phosphate dehydrogenase%2C NAD-dependent	0,00044	0,18

BW25113_3844	<i>fre</i>	NAD(P)H-flavin reductase	0,00119	0,25
Transport (n = 13)				
BW25113_0462	<i>acrB</i>	multidrug efflux system protein	0,00000	0,04
BW25113_0463	<i>acrA</i>	multidrug efflux system	0,00001	0,00
BW25113_3035	<i>tolC</i>	transport channel	0,00059	0,05
BW25113_1290	<i>sapF</i>	antimicrobial peptide transport ABC system ATP-binding protein	0,00068	0,05
BW25113_1291	<i>sapD</i>	antimicrobial peptide transport ABC system ATP-binding protein	0,00165	0,02
BW25113_1292	<i>sapC</i>	antimicrobial peptide transport ABC transporter permease	0,00112	0,01
BW25113_1293	<i>sapB</i>	antimicrobial peptide transport ABC transporter permease	0,00041	0,04
BW25113_1294	<i>sapA</i>	antimicrobial peptide transport ABC transporter periplasmic binding prote	0,00145	0,10
BW25113_1691	<i>ydiN</i>	MFS transporter superfamily protein	0,00001	0,24
BW25113_1857	<i>znuA</i>	zinc transporter subunit: periplasmic-binding component of ABC superfar	0,00003	0,11
BW25113_3204	<i>ptsN</i>	sugar-specific enzyme IIA component of PTS	0,01588	0,00
BW25113_3290	<i>trkA</i>	NAD-binding component of TrK potassium transporter	0,00006	0,03
BW25113_3849	<i>trkH</i>	potassium transporter	0,00029	0,17
Regulation (n = 18)				
BW25113_0676	<i>nagC</i>	N-acetylglucosamine-inducible nag divergent operon transcriptional repre	0,00003	0,15
BW25113_1235	<i>rssB</i>	PcnB-degradosome interaction factor%3B response regulator	0,00203	0,11
BW25113_1882	<i>cheY</i>	chemotaxis regulator transmitting signal to flagellar motor component	0,00227	0,17
BW25113_2216	<i>rcsD</i>	phosphotransfer intermediate protein in two-component regulatory syste	0,00193	0,25
BW25113_2340	<i>sixA</i>	phosphohistidine phosphatase	0,00000	0,03
BW25113_2571	<i>rseB</i>	anti-sigma E factor%2C binds RseA	0,00048	0,10
BW25113_2572	<i>rseA</i>	anti-sigma factor	0,00159	0,07
BW25113_3026	<i>qseC</i>	quorum sensing sensory histidine kinase in two-component regulatory sys	0,00181	0,08
BW25113_3032	<i>cpdA</i>	3'%2C5' cAMP phosphodiesterase	0,01912	0,14
BW25113_3229	<i>sspA</i>	stringent starvation protein A%2C phage P1 late gene activator%2C RNAP-	0,00003	0,05
BW25113_3404	<i>envZ</i>	sensory histidine kinase in two-component regulatory system with OmpR	0,00075	0,07
BW25113_3405	<i>ompR</i>	response regulator in two-component regulatory system with EnvZ	0,00768	0,03
BW25113_3806	<i>cyaA</i>	adenylate cyclase	0,00009	0,14
BW25113_3842	<i>rfaH</i>	transcription antitermination protein	0,00001	0,19
BW25113_3912	<i>cpxR</i>	response regulator in two-component regulatory system with CpxA	0,00671	0,04
BW25113_3938	<i>metJ</i>	transcriptional repressor%2C S-adenosylmethionine-binding	0,02059	0,17
BW25113_4000	<i>hupA</i>	HU%2C DNA-binding transcriptional regulator%2C alpha subunit	0,00665	0,03
BW25113_4401	<i>arcA</i>	response regulator in two-component regulatory system with ArcB or Cpx	0,02265	0,07
Other (n = 16)				
BW25113_0417	<i>thiL</i>	thiamine monophosphate kinase	0,00828	0,11
BW25113_0558	<i>ybcV</i>	DLP12 prophage%3B uncharacterized protein	0,03649	0,09
BW25113_0636	<i>rlmH</i>	23S rRNA m(3)Psi1915 pseudouridine methyltransferase%2C SAM-depenc	0,03573	0,09
BW25113_0784	<i>moaD</i>	molybdopterin synthase%2C small subunit	0,04260	0,08
BW25113_0960	<i>yccS</i>	putative transporter%2C FUSC superfamily inner membrane protein%2C t	0,00002	0,06
BW25113_1182	<i>hlyE</i>	hemolysin E	0,00274	0,19
BW25113_2352	<i>gtrS</i>	serotype-specific glucosyl transferase%2C CPS-53 (KpLE1) prophage	0,00019	0,17
BW25113_2525	<i>fdx</i>	[2Fe-2S] ferredoxin	0,04572	0,05
BW25113_2808	<i>gcvA</i>	glycine cleavage system transcriptional activator%3B autorepressor	0,00006	0,08
BW25113_2827	<i>thyA</i>	thymidylate synthetase	0,04872	0,01
BW25113_3095	<i>yqjA</i>	general envelope maintenance protein%3B DedA family inner membrane	0,00176	0,01
BW25113_3357	<i>crp</i>	cAMP-activated global transcription factor%2C mediator of catabolite rep	0,00679	0,05
BW25113_3389	<i>aroB</i>	3-dehydroquininate synthase	0,00013	0,17
BW25113_3390	<i>aroK</i>	shikimate kinase I	0,00050	0,00
BW25113_4174	<i>hflK</i>	modulator for HflB protease specific for phage lambda cII repressor	0,00013	0,06
BW25113_4175	<i>hflC</i>	modulator for HflB protease specific for phage lambda cII repressor	0,00110	0,16
Unknown (n = 14)				
BW25113_1001	<i>yccE</i>	uncharacterized protein	0,00015	0,14
BW25113_1085	<i>yceQ</i>	uncharacterized protein	0,00007	0,06
BW25113_1459	<i>yncl</i>	yncl	0,00237	0,18
BW25113_1472	<i>yddL</i>	yddL	0,00233	0,05
BW25113_2144	<i>sanA</i>	vancomycin high temperature exclusion protein%2C DUF218 superfamily	0,00000	0,00
BW25113_2273	<i>yfbN</i>	uncharacterized protein	0,04376	0,21
BW25113_2317	<i>dedA</i>	DedA family inner membrane protein	0,00111	0,06
BW25113_3233	<i>yhcB</i>	DUF1043 family inner membrane-anchored protein	0,00155	0,07
BW25113_3920	<i>yjiQ</i>	DUF1454 family putative periplasmic protein	0,00000	0,10
BW25113_4048	<i>yjbM</i>	uncharacterized protein	0,04848	0,14
BW25113_4280	<i>yjhC</i>	putative oxidoreductase	0,00030	0,23

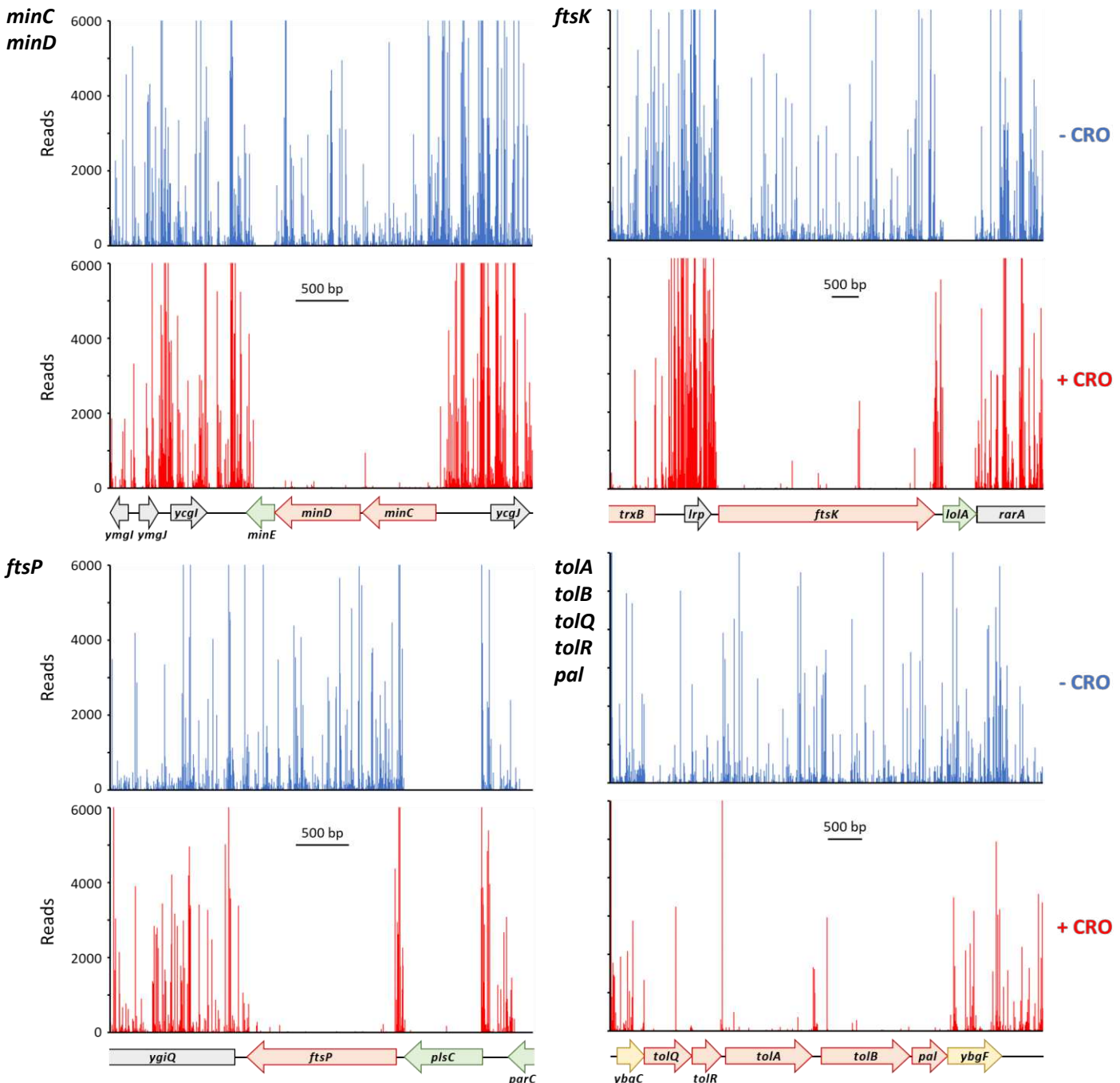
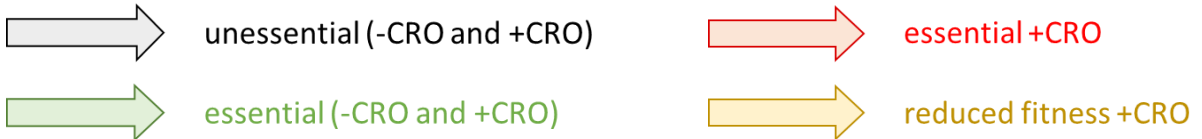
BW25113_4325	<i>yjiC</i>	uncharacterized protein	0,00096	0,08
BW25113_4651	<i>yibW</i>	yibW	0,00519	0,12
BW25113_4660	<i>yhiL</i>	yhiL	0,01559	0,12

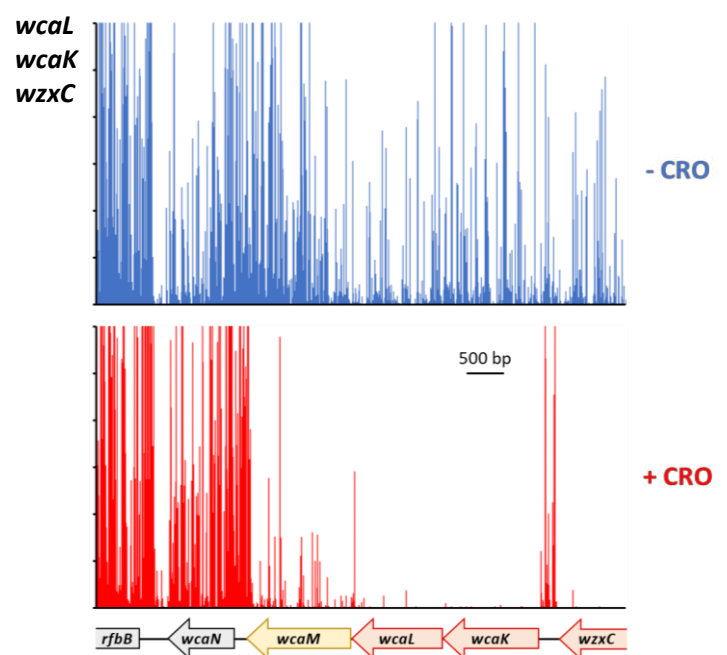
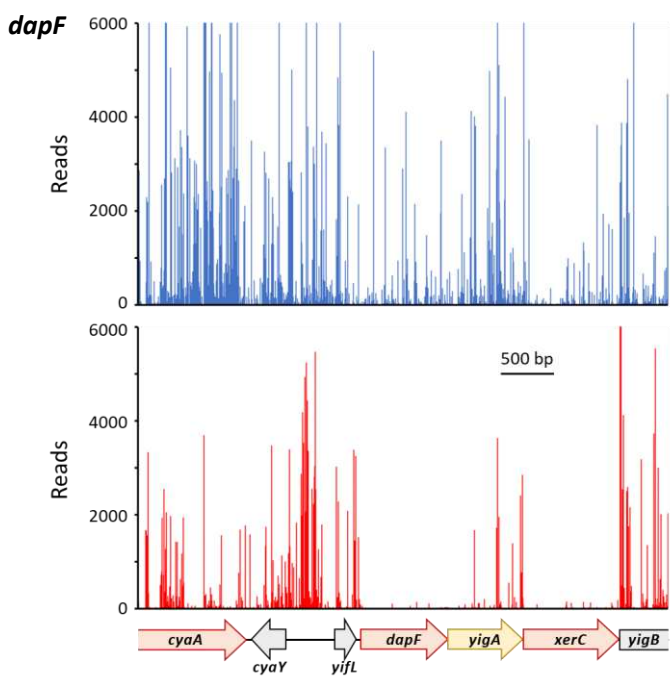
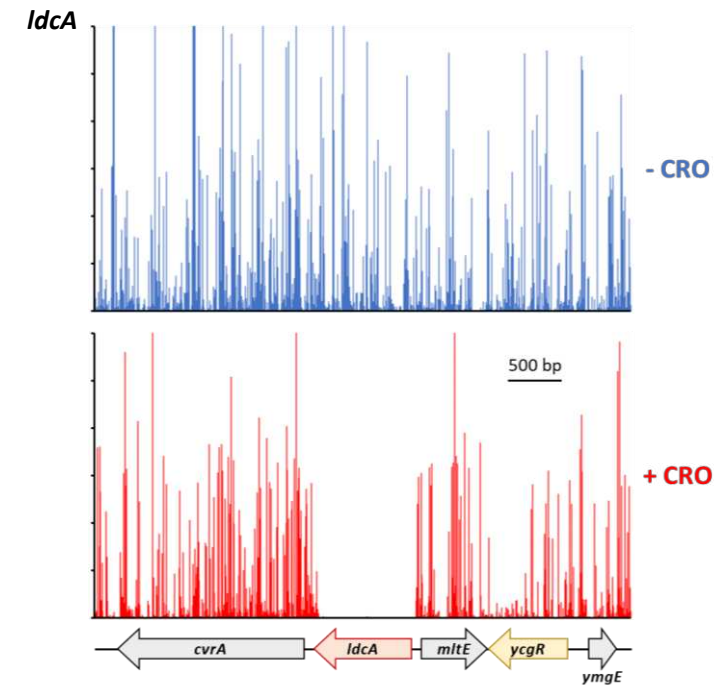
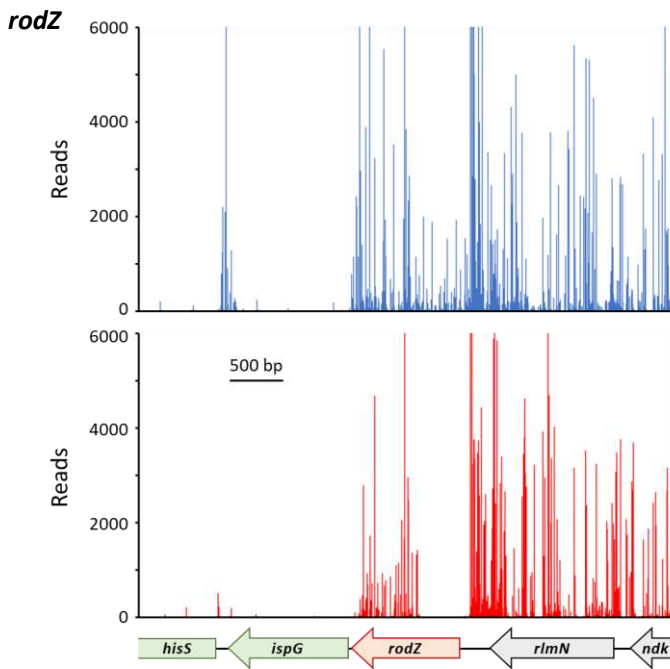
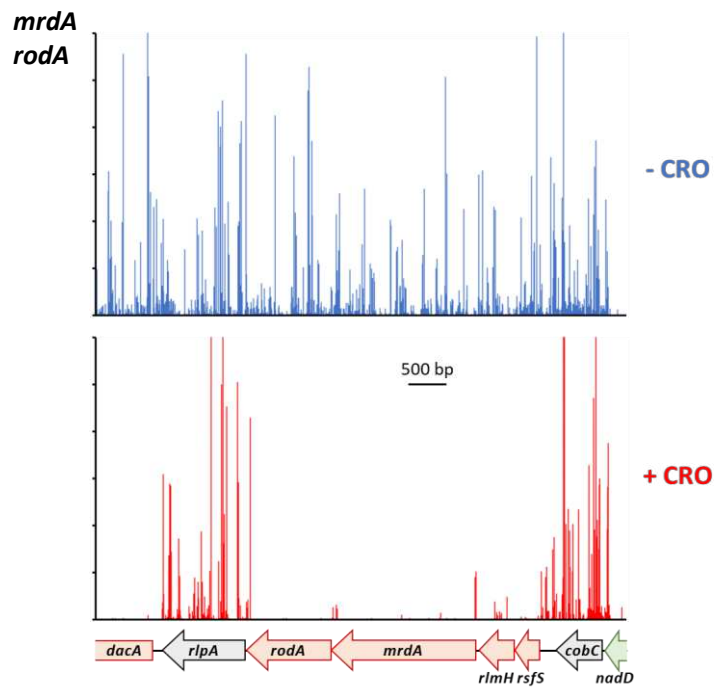
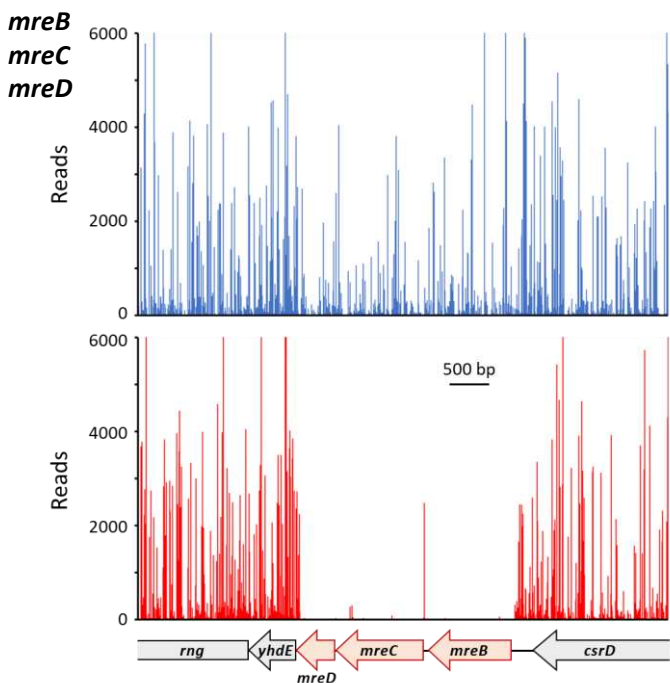


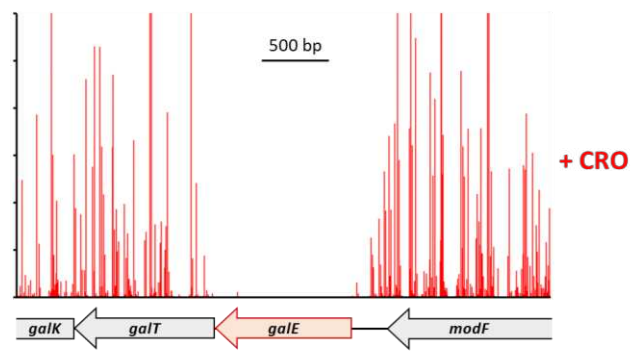
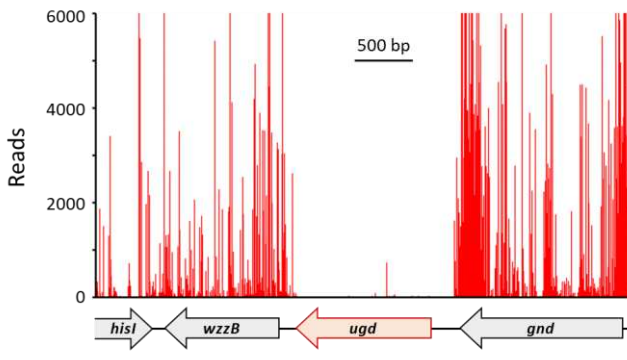
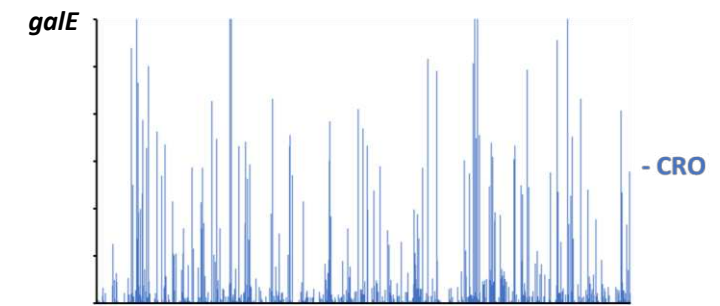
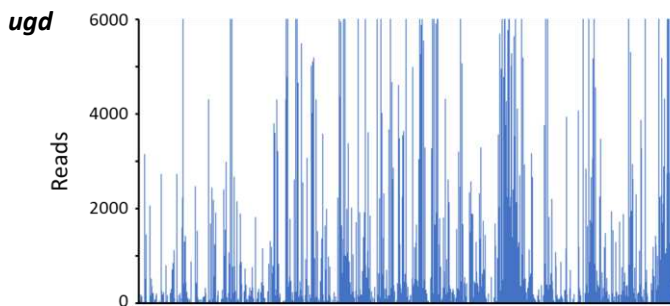
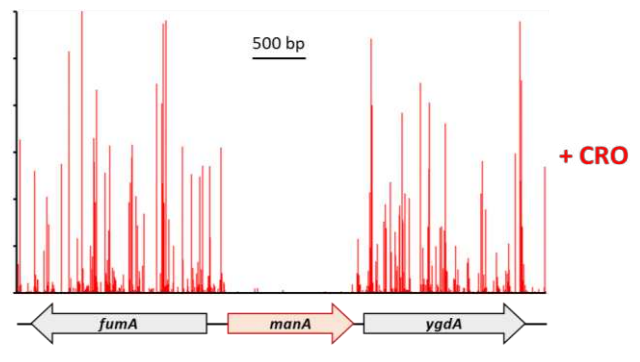
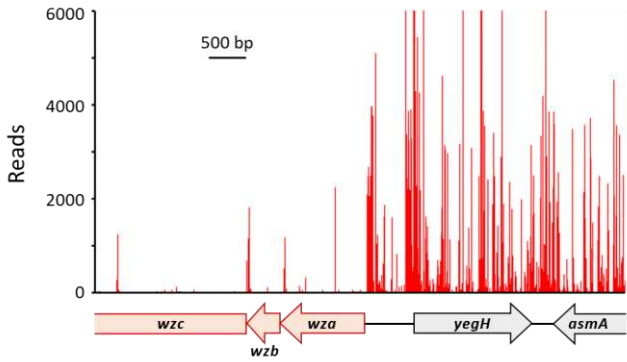
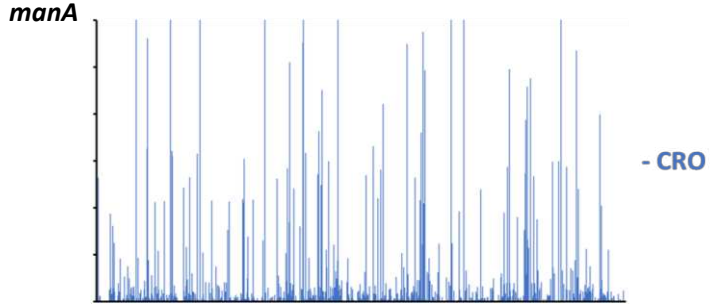
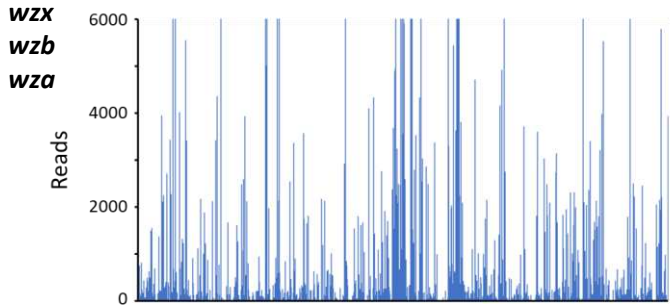
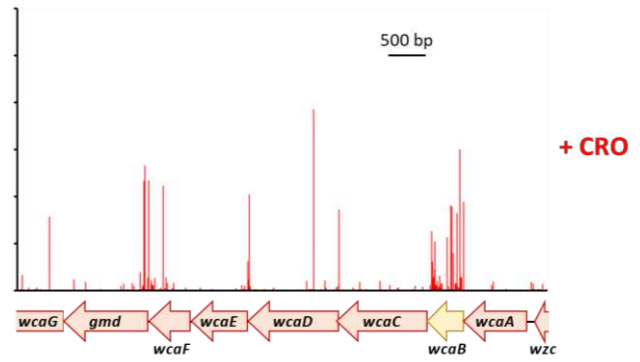
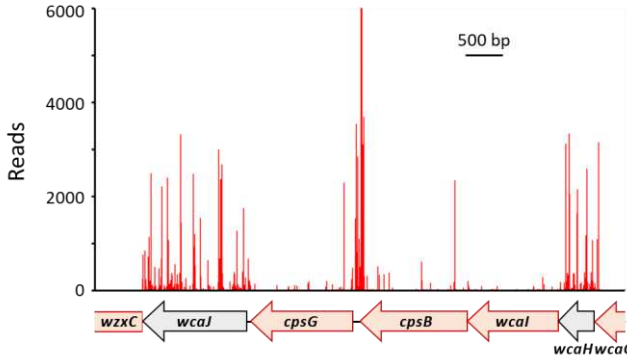
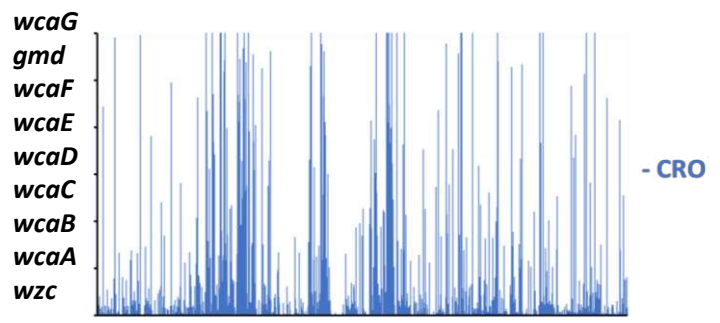
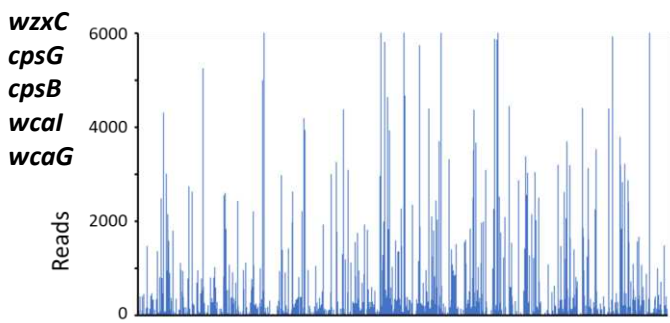
Supplementary Data file 2

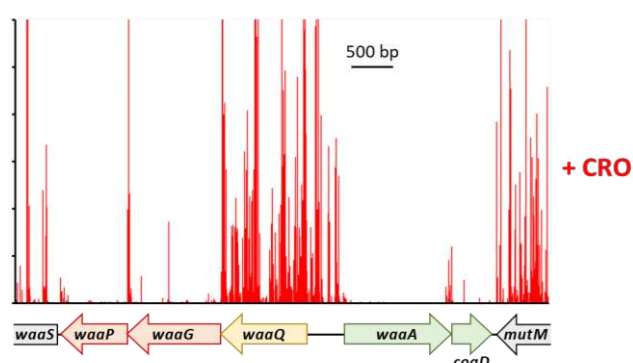
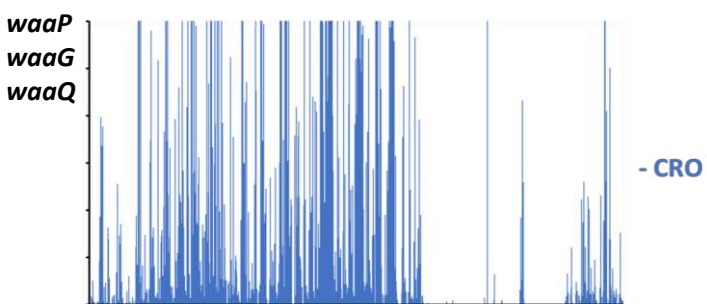
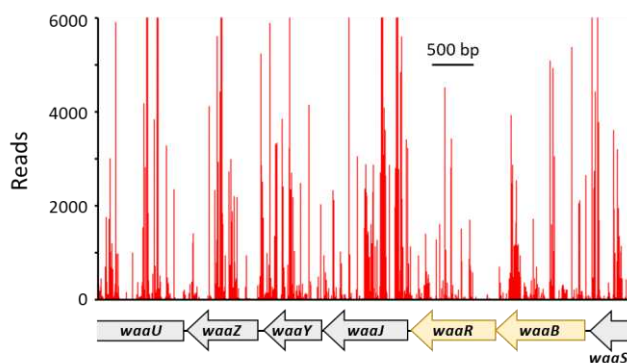
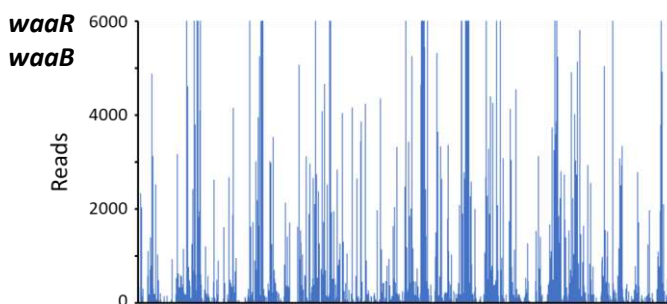
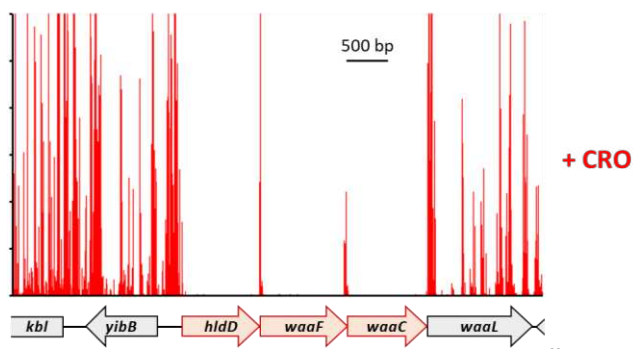
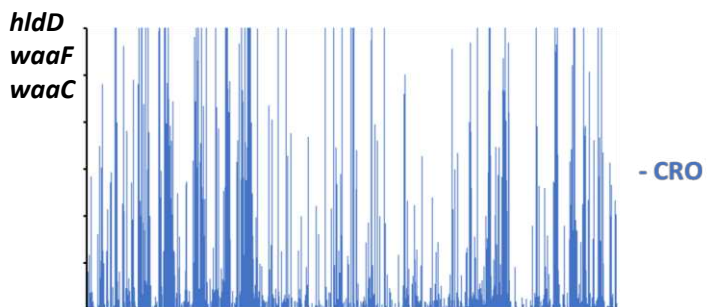
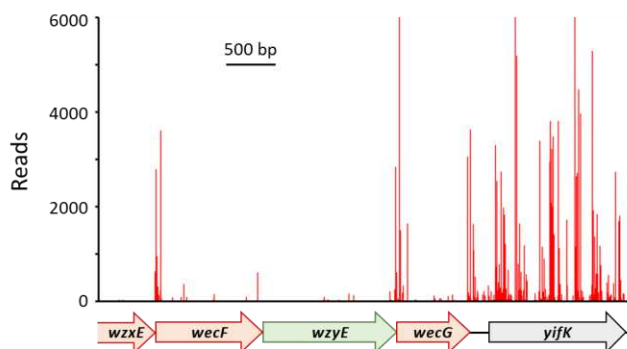
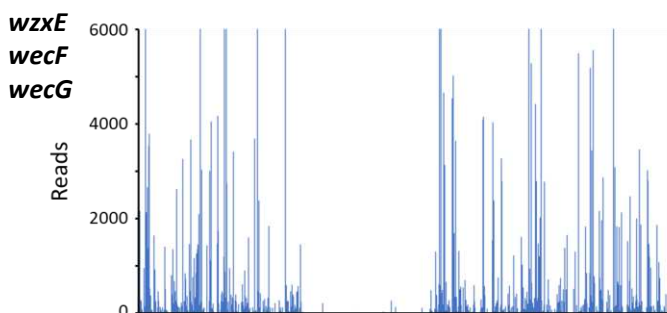
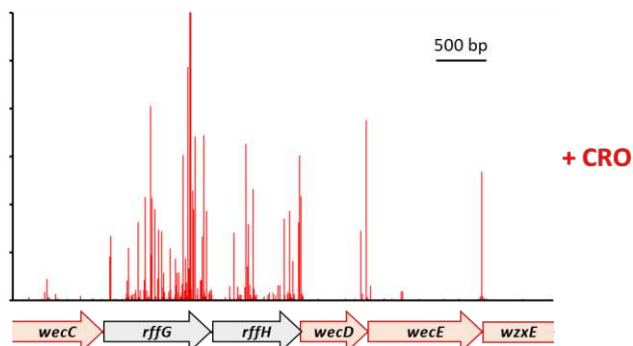
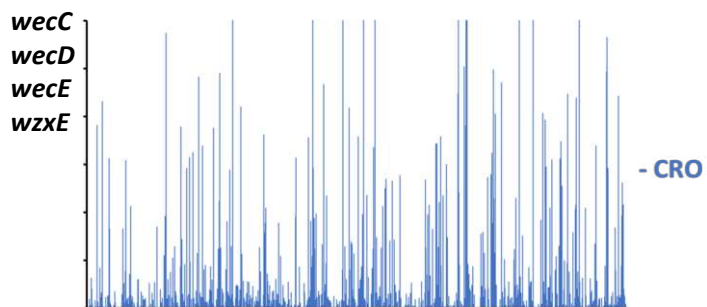
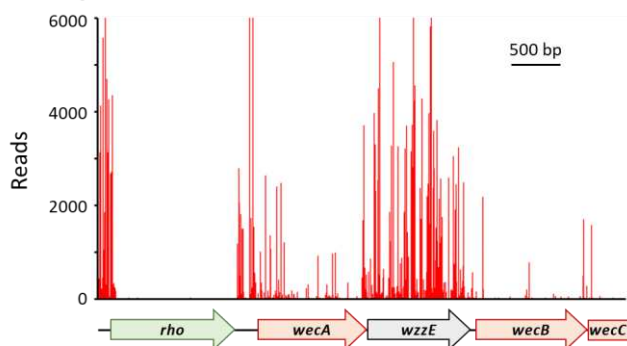
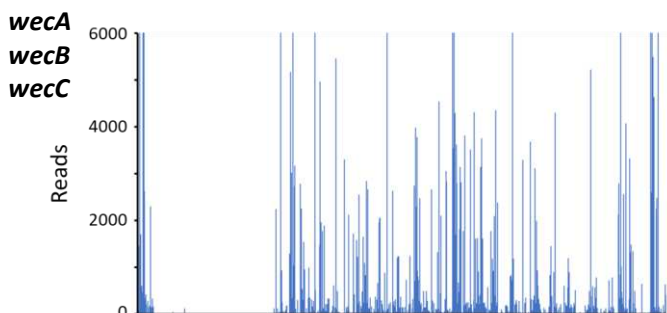
Tn-seq insertion profiles of relevant genes discussed in the manuscript. Reading frames are indicated at the bottom of the panel and color coded: gray, genes unessential in either condition; green, genes essential for both -CRO and +CRO; red, genes selectively essential for +CRO; yellow, genes for which inactivation induces a reduced fitness for +CRO. Transposon insertion sites are indicated by lines above the reading frames with their height reflecting the number of reads for each insertion.

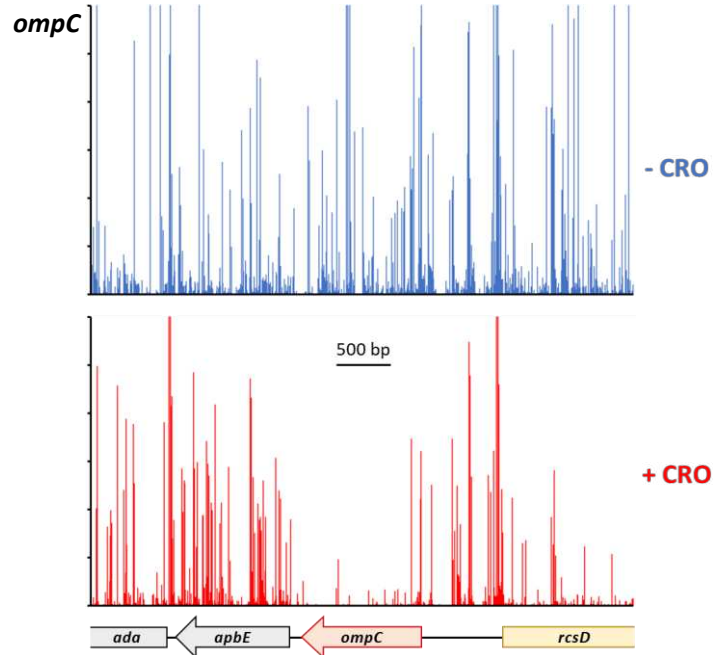
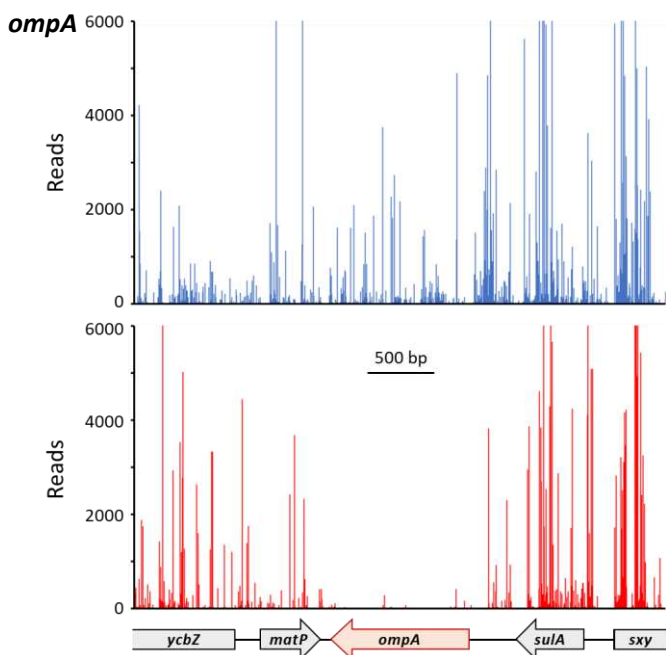
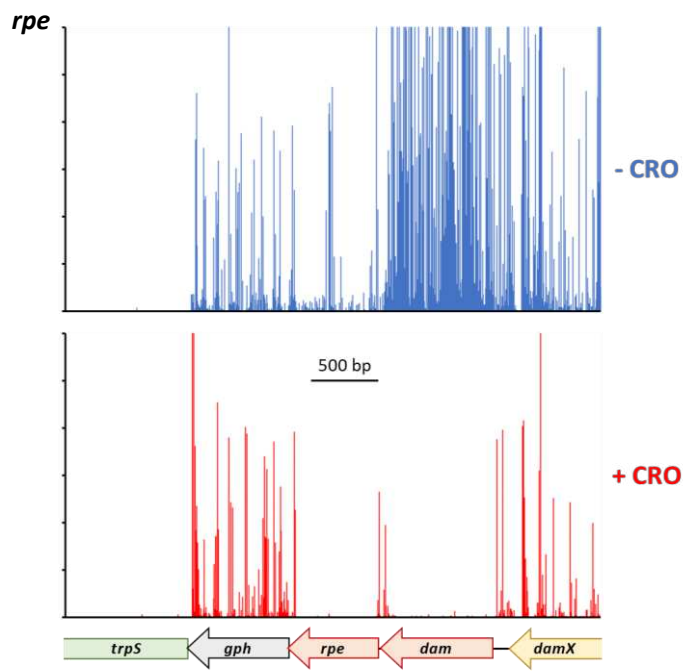
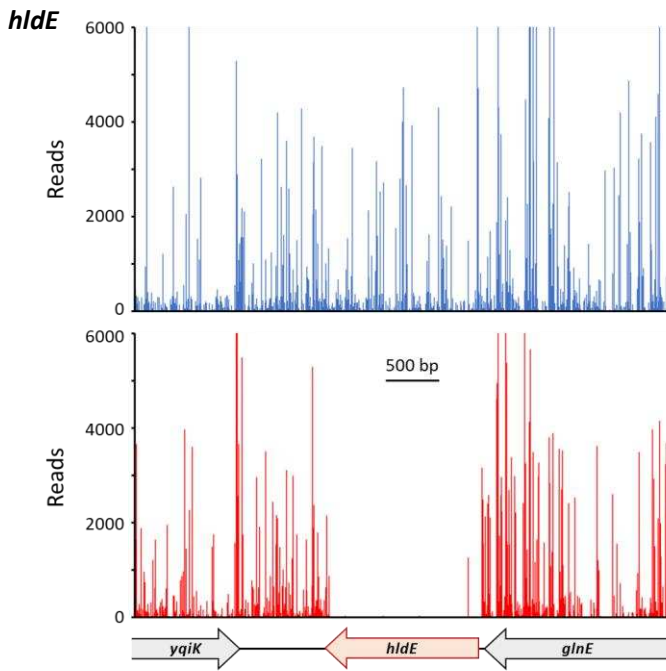
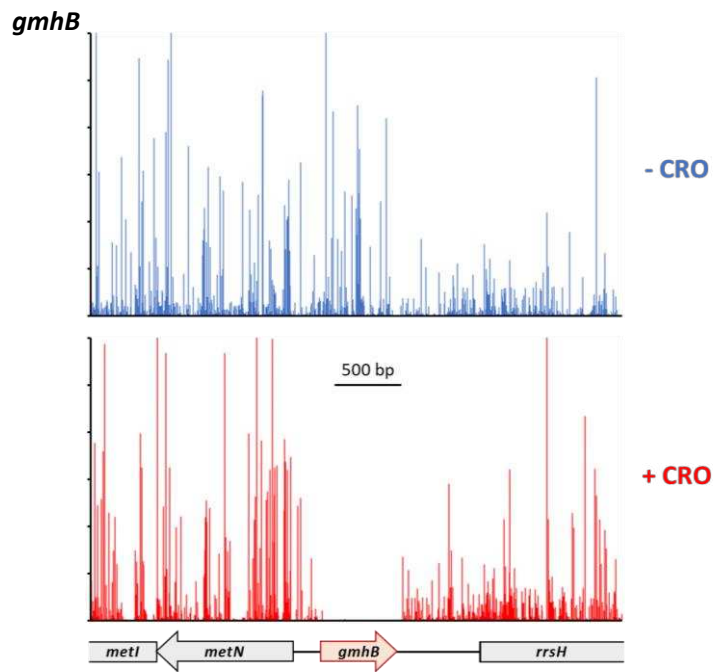
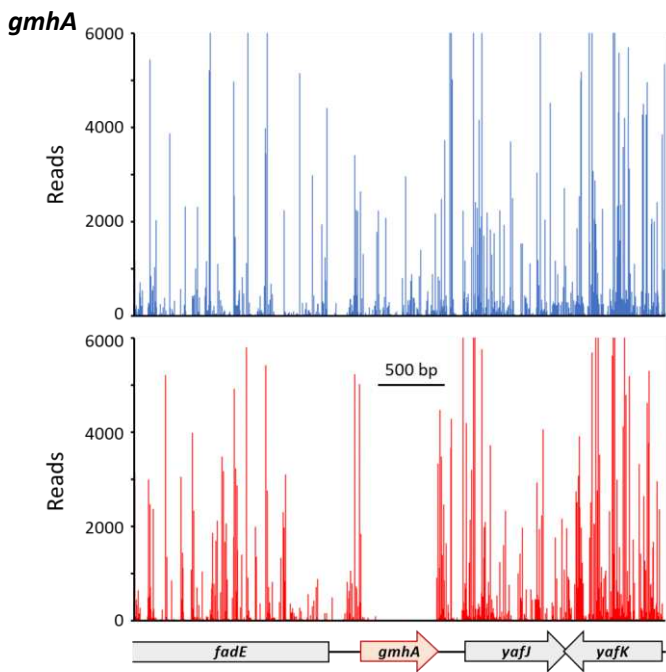
Color code:











Conclusion

L'activité D,D-transpeptidase des PBP a été identifiée comme la cible principale des antibiotiques β -lactamines dans les années 1960, mais la cascade d'événements conduisant à la mort bactérienne fait toujours l'objet d'intenses recherches. Dans l'article 2, nous avons utilisé une approche Tn-seq pour identifier les gènes essentiels, en présence de β -lactamines, au contournement des PBP par la L,D-transpeptidase YcbB. Nous montrons comment la perte d'une fonction spécifique peut avoir des effets pléiotropes sur une grande variété de processus cellulaires et fournissons une approche expérimentale pour leur identification. Nous démontrons que la liaison des β -lactamines à leurs cibles principales, les PBP, déclenche une série complexe de réponses cellulaires bien que l'activité D,D-transpeptidase des PBP n'ait pas de rôle direct dans la synthèse du peptidoglycane dans notre modèle. Notre approche à l'échelle du génome a révélé que la croissance en présence de β -lactamines nécessite à la fois la réticulation du peptidoglycane médiée par YcbB, avec ses différents partenaires fonctionnels, ainsi que l'intégrité physicochimique de la membrane externe. Notre analyse apporte des preuves convaincantes que la membrane externe, au-delà de son rôle bien connu de barrière de perméabilité, est un acteur insoupçonné dans le mode d'action des β -lactamines et dans le mécanisme de résistance à ces antibiotiques.

3. Rôle du (p)ppGpp dans l'expression de la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB

Introduction

La résistance aux β -lactamines médiée par la L,D-transpeptidase YcbB nécessite la production de l'alarmone (p)ppGpp (Hugonnet et al. 2016). Nous avons peu de connaissances sur le lien entre la synthèse du peptidoglycane et le (p)ppGpp. Chez *E. coli*, le (p)ppGpp a des effets pléiotropes sur un ensemble de fonctions métaboliques. Les effets directs du (p)ppGpp, c'est-à-dire l'inhibition ou l'activation de cibles par la fixation de l'alarmone, pourraient permettre l'activation de la résistance en ciblant des enzymes spécifiques du peptidoglycane. De même, les effets indirects du (p)ppGpp, c'est-à-dire la modulation de l'expression des gènes par la fixation de cette alarmone à l'ARN polymérase, pourraient permettre d'activer la résistance aux β -lactamines en modulant l'expression de gènes spécifiques.

Le troisième article, en cours d'écriture, se focalise sur le rôle du (p)ppGpp dans l'activation du mécanisme de résistance. Cette étude se base sur la construction de mutants capables de résister aux β -lactamines grâce à YcbB mais en absence de production de (p)ppGpp. Nous démontrons ainsi que le (p)ppGpp active le mécanisme de résistance en se fixant à l'ARN polymérase et en modulant son activité. La fixation du (p)ppGpp au site 2 de l'ARN polymérase et l'action de DksA activent la résistance. Nous montrons ensuite que parmi les nombreux effets du (p)ppGpp, la diminution de la transcription des ARN ribosomiaux est suffisante pour conférer la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB. La surproduction d'endopeptidases, démontrée comme diminuant le cycle futile de synthèse et de dégradation du peptidoglycane en stimulant la synthèse de peptidoglycane par les PBP de classe A, permet également l'expression de la résistance en absence de (p)ppGpp. Ces résultats, ainsi que l'essentialité de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN révélée par Tn-seq, suggère que le (p)ppGpp active la résistance en diminuant le nombre de ribosomes et la demande énergétique induite par le cycle futile, ce qui protégerait les cellules du stress oxydant induit par les β -lactamines.

Article 3

β -lactam resistance in *Escherichia coli* requires (p)ppGpp-mediated downregulation of ribosomal RNA transcription

Henri Voedts¹, Michel Arthur^{1#*}, and Jean-Emmanuel Hugonnet^{1#*}

¹ Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, Inserm, Université Paris Cité, F-75006 Paris, France.

Equal contributions

* Corresponding authors: michel.arthur@crc.jussieu.fr; jean-emmanuel.hugonnet@crc.jussieu.fr

INTRODUCTION

Bacteria, including major pathogens, adapt to the environment by multiple molecular mechanisms. The ubiquitous stringent response is triggered in response to diverse stresses such as amino acid or phosphate starvation¹. The stringent response relies on the production of the alarmones ppGpp (guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate) and pppGpp (guanosine 5'-triphosphate 3'-diphosphate) [collectively referred to as (p)ppGpp]. In most *Betaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*, (p)ppGpp production involves two homologues named RelA and SpoT. RelA is a monofunctional enzyme that possesses only (p)ppGpp synthase activity while SpoT is a bifunctional enzyme with both (p)ppGpp synthetic and hydrolytic activities. In Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*, (p)ppGpp has both direct and indirect effects. (p)ppGpp directly activates or inhibits several enzymes involved in multiple metabolic pathways such as the GuaB IMP dehydrogenase, the DnaG DNA primase, the PPX polyphosphate kinase or the PpnN nucleosidase (Fig. 1)². (p)ppGpp also indirectly modulates the expression of *ca.* 750 genes by binding to RNA polymerase (RNAP) and altering its promoter selectivity and stability³. (p)ppGpp binds to RNAP at two sites at the interface between the β' and ω subunits (site 1) and at the interface between the β' subunit and the transcription factor DksA (site 2)⁴.

Peptidoglycan is an essential macromolecule that surrounds the bacterial cell providing resistance to the osmotic pressure of the cytoplasm⁵. The disaccharide-pentapeptide subunits of peptidoglycan are polymerized to form glycan strands that are linked to each other by

transpeptidases. The latter reaction is performed by D,D-transpeptidases, which belong to the penicillin-binding protein family (PBP) and form 4→3 cross-links connecting the fourth residue (D-Ala⁴) of an acyl donor stem to the third residue (DAP³) of an acyl acceptor stem. The unrelated L,D-transpeptidases (LDTs) catalyze the formation of 3→3 cross-links connecting two DAP³ residues. PBPs and LDTs show distinct inhibition profiles since PBPs are potentially inhibited by all classes of β-lactams (including penams, cepheims, and carbapenems) whereas LDTs are effectively inhibited only by carbapenems⁶. Bypass of PBPs by LDTs, which leads to high-level resistance to β-lactams of the penam (such as ampicillin) and cephem (ceftriaxone) classes, was previously reported in *E. coli* strains that overproduce the YcbB L,D-transpeptidase (LdtD) and the (p)ppGpp alarmone⁷. (p)ppGpp production that activates YcbB-mediated β-lactam resistance was either triggered by (i) substitutions in aminoacyl-tRNA synthetases that mimic amino acid starvation and activate the synthase activity of RelA or (ii) by expression of a truncated allele of *relA* that encodes the RelA' synthase mediating constitutive production of (p)ppGpp. In this study, we investigate the role of the (p)ppGpp alarmone in β-lactam resistance.

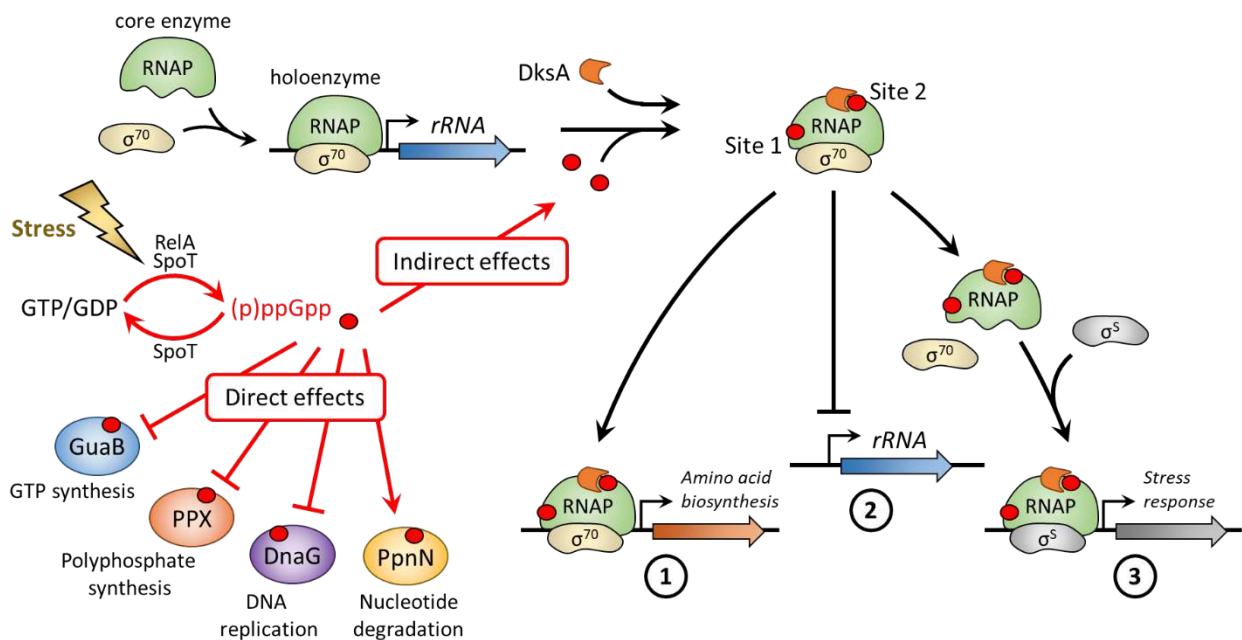


Figure 1. Direct and indirect effects of (p)ppGpp during the stringent response. Direct effects include activation of PpnN and inhibition of DnaG, GuaB, PPX and other enzymes involved in various metabolic pathways. Indirect effects include binding of (p)ppGpp to two sites on RNAP and modulation of gene expression by (1) activation of specific promoters involved in amino acid synthesis, (2) inhibition of specific promoters involved in expression of ribosomal genes, and (3) recruitment of alternative sigma factors.

RESULTS

Production of the (p)ppGpp alarmone does not alter peptidoglycan composition. Production of the (p)ppGpp alarmone by a truncated allele of *relA* encoding the RelA' synthase had little to no impact on the chemical composition of peptidoglycan subunits, on the relative proportion monomers and dimers, and on the relative proportion of cross-links generated by transpeptidases of the D,D (4→3 cross-links) or L,D (3→3 cross-links) specificities (Fig. 2; Supplementary Fig. S1A). This observation suggests that the alarmone does not directly modulate the activity of enzymes involved in peptidoglycan metabolism. In contrast, production of YcbB alone resulted in an increase in tripeptide monomers to the detriment of tetrapeptide monomers, an increase in the proportion of 3→3 cross-linked dimers, and no difference in that of 4→3 cross-linked dimers, leading to an overall increase in the proportion of dimers to the detriment of monomers (Fig. 2; Supplementary Fig. S1B). Production of RelA' in addition to YcbB did not result in further modification of the peptidoglycan structure. This observation suggests that the alarmone does not modulate the activity of enzymes specifically involved in peptidoglycan polymerization mediated by YcbB.

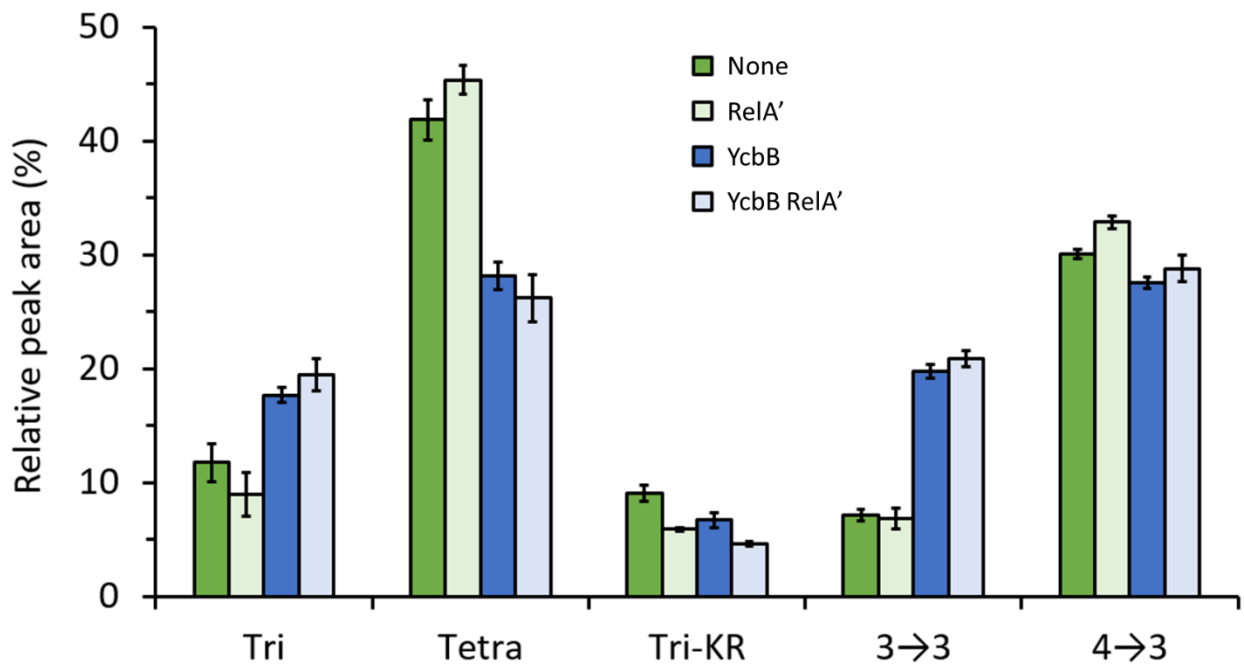
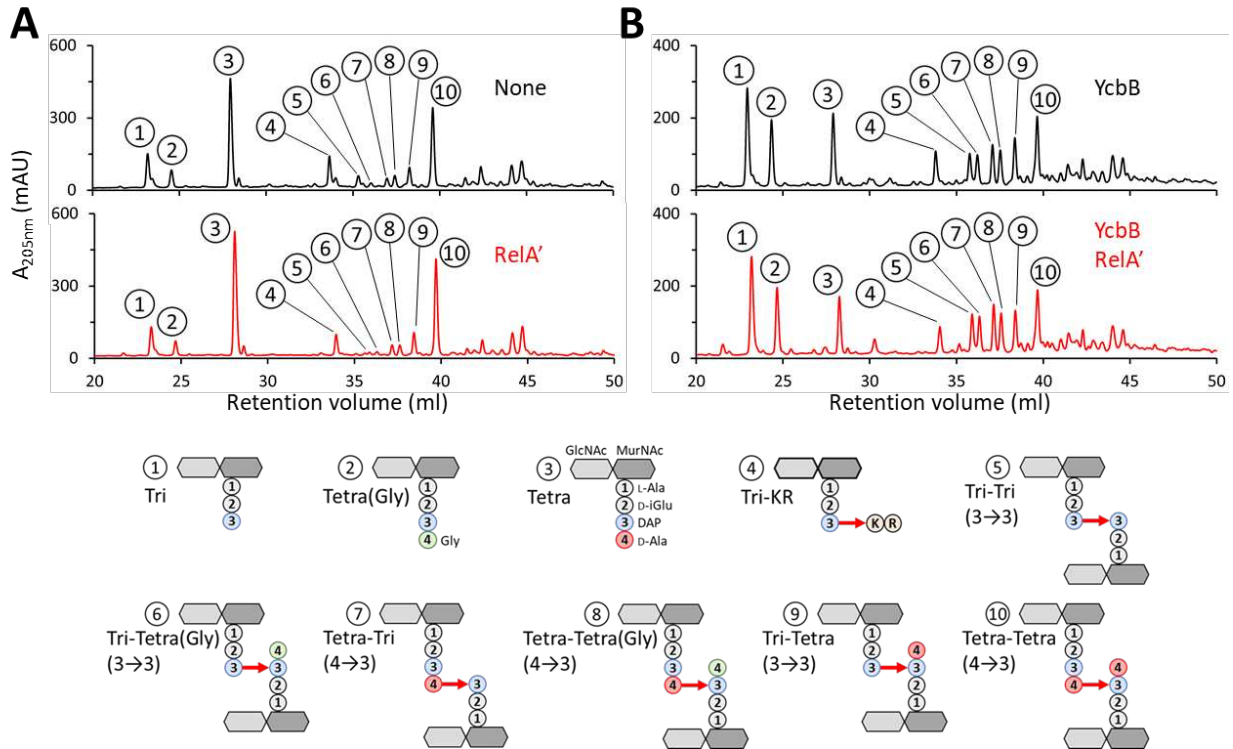


Figure 2. Impact of (p)ppGpp production on peptidoglycan. Peptidoglycan was extracted, digested by muramidases, and the resulting muropeptides were separated by *rp*HPLC. Peptidoglycan was extracted from derivatives of strains BW25113 Δ *relA* harboring vectors pHV6 and pHV7 (dark green), vector pHV6 and plasmid pKT8(*relA'*) (light green),

vector pHV7 and plasmid pKT2(*ycbB*) (dark blue), and plasmids pKT2(*ycbB*) and pKT8(*relA'*) (light blue). pHV6 and pHV7 are the vectors used for construction of pKT2(*ycbB*) and pKT8(*relA'*), respectively. The growth medium contained tetracycline (to counter select loss of pHV6 and pKT2) and chloramphenicol (to counter select loss of pHV7 and pKT8). All cultures contained 40 μ M IPTG for induction of the P_{trc} promoter of pHV6 and pKT2(*ycbB*) and 1% L-arabinose for induction of the P_{araBAD} promoter of pHV7 and pKT8(*relA'*). Data are means from three biological repeats. See Supplementary Fig. S1 for representative chromatograms.



Supplementary Figure S1. Peptidoglycan analyses of strain BW15113 Δ relA and derivatives producing RelA' and YcbB alone or in combination. Peptidoglycan was extracted, digested by muramidases, and the resulting muropeptides were separated by *rp*HPLC (mAU, milli-absorbance unit, $\lambda=205$ nm). The structure of muropeptides in *rp*HPLC peaks 1 to 10 was identified by mass spectrometry. (A) *rp*HPLC profile of muropeptides from strains BW15113 Δ relA harboring plasmids pHV6 and pHV7 (black) or pHV6 pKT8(*relA'*) (red). (B) *rp*HPLC profile of muropeptides from strains BW15113 Δ relA harboring plasmids pKT2(*ycbB*) pHV7 (black) or pKT2(*ycbB*) pKT8(*relA'*) (red). Bacteria were grown in the presence of IPTG and L-arabinose for induction of *ycbB* and *relA'*, respectively. pHV6 and pHV7 are the vectors used for construction of pKT2(*ycbB*) and pKT8(*relA'*), respectively. Tetra, tetrapeptide L-Ala-D-iGlu-DAP-D-Ala; Tri, tripeptide L-Ala-D-iGlu-DAP; Tri-KR, tripeptide L-Ala-D-iGlu-DAP substituted by the dipeptide Lys-Arg originating from the Braun lipoprotein; Tri-Tri and Tri-Tetra, dimers containing a tripeptide donor stem linked to a tripeptide or tetrapeptide acceptor, respectively. These dimers contained a 3 \rightarrow 3 cross-link formed by the YcbB L,D-transpeptidase. Tetra-Tri and Tetra-Tetra, dimers containing a tetrapeptide donor linked to a tripeptide or tetrapeptide acceptor, respectively. These dimers contained a 4 \rightarrow 3 cross-link formed by the D,D-transpeptidases belonging to the PBP family; Tetra(Gly), Tri-Tetra(Gly), and Tetra-Tetra(Gly), muropeptides containing a Gly residue instead of D-Ala at the 4th position of the free stem. These muropeptides originated from the exchange of D-Ala by Gly catalyzed by L,D-transpeptidases. Data are representative chromatograms from three biological repeats.

The essential role of the (p)ppGpp alarmone in YcbB-mediated β -lactam resistance depends upon modulation of RNA polymerase activity. We anticipated that mutations enabling expression of β -lactam resistance in a (p)ppGpp⁰ background ($\Delta relA \Delta spoT$) could map in the target of the alarmone and thereby lead to its identification. To test this possibility, we plated *E. coli* strain BW25113 $\Delta relA \Delta spoT$ pJEH12(*ycbB*) on agar containing 50 μ M IPTG for *ycbB* induction and 32 μ g/ml ampicillin. Mutants resistant to all β -lactams except carbapenems, the hallmark of bypass of PBPs by YcbB, were obtained at a frequency of *ca.* 2×10^{-8} . Expression of β -lactam resistance by the mutants required induction of the *ycbB* gene by IPTG indicating that the resistant phenotype was dependent on high-level production of the YcbB L,D-transpeptidase. Sequencing of the genome of five mutants revealed single mutations leading to amino acid substitutions in the β or β' RNAP subunits (Table 1). This observation indicates that the role of (p)ppGpp in YcbB-mediated β -lactam resistance is indirect and requires modulation of RNAP functions.

Selection for mecillinam resistance in a (p)ppGpp⁰ background leads to mutations affecting RNAP and to co-resistance to ampicillin upon *ycbB* induction. Acquisition of resistance to mecillinam (amdinocillin), a β -lactam specific to the elongasome-associated class B PBP2, is known to result from mutations in multiple genes indirectly leading to increased production of (p)ppGpp in most cases⁸. We thought to determine whether mutations leading to mecillinam resistance in a (p)ppGpp⁰ background map in genes encoding RNAP subunits and whether these mutations also enable YcbB-mediated resistance to other β -lactams. To address these questions, we plated *E. coli* strain BW25113 $\Delta relA \Delta spoT$ pJEH12(*ycbB*) on agar containing 50 μ g/ml mecillinam and 10 μ g/ml tetracycline to counter select loss of plasmid pJEH12(*ycbB*). Mutants resistant to mecillinam (frequency of *ca.* 3×10^{-8}) were all (12 out of 12) resistant to ampicillin upon induction of *ycbB* by 50 μ M IPTG. DNA sequencing was performed for the genome of 5 of these 12 mutants and for a portion of the *rpoB* gene (positions 385 to 2,109) for the remaining 7 mutants. Mutations leading to substitutions in the β or β' subunit RNAP subunits were detected in each of the 12 mutants (Table 1). These results indicate that all mutations leading to mecillinam resistance in a (p)ppGpp⁰ background affect RNAP and enable YcbB-mediated resistance to all β -lactams except carbapenems. Thus, dissociated resistance to mecillinam or ampicillin was not

observed upon selection of derivatives of BW25113 $\Delta relA \Delta spoT$ pJEH12(*ycbB*) on agar containing either antibiotic.

Selection with β -lactams or rifampicin leads both to dissociated and co-resistance to representatives of these drug families. Substitutions in the β subunits were localized in a region which determines rifampicin resistance⁹. The collection of 17 mutants selected on ampicillin (N=5) or mecillinam (N=12) was screened for expression of rifampicin resistance by the disk diffusion assay revealing co-resistance in 2 out of 5 and 6 out of 12 mutants, respectively (Table 1). We then plated the strain BW25113 $\Delta relA \Delta spoT$ pJEH12(*ycbB*) on agar containing 16 $\mu\text{g/ml}$ rifampicin and 10 $\mu\text{g/ml}$ tetracycline to counter select loss of plasmid pJEH12(*ycbB*). All rifampicin-resistant mutants (10 out of 10) selected on rifampicin harbored mutations in the β subunit-encoding gene of RNAP (frequency of *ca.* 9×10^{-7}). These rifampicin-resistant mutants included both β -lactam-resistant and -susceptible mutants (6 and 4 out of 10, respectively). Therefore, in the entire collection of mutants (N=27), 16 distinct amino acid substitutions were detected in RNAP subunits, 4 in mutants resistant to rifampicin only, 4 in mutants resistant to β -lactams only, and 8 in co-resistant mutants. These results indicate that substitutions in the β or β' RNAP subunits result both in dissociate resistance to β -lactams or rifampicin and to co-resistance to both types of drugs in spite of their unrelated mode of action.

A reduced growth-rate is not sufficient for YcbB-mediated β -lactam resistance. Since the intracellular concentration of (p)ppGpp controls the growth rate we considered the possibility that the alarmone and RNAP substitutions might merely act by reducing the growth rate, thereby compensating for ineffective peptidoglycan polymerization by YcbB¹⁰. To investigate this possibility, we determined the growth rate of 12 mutants representative of the three β -lactam and rifampicin resistance phenotypes (Table 1). This analysis revealed that a reduced growth rate was not in itself sufficient for β -lactam resistance since mutants harboring the substitutions Gln¹⁴⁸Leu, Gln¹⁴⁸Arg, Leu¹⁴⁹Arg, and Ile⁵⁷²Leu were resistant to rifampicin but susceptible to ceftriaxone in spite of an extended generation time (28 ± 2 min instead of 24 ± 1 min for the parental strain) whereas the mutant harboring the substitution Gly⁴⁴⁹Val was co-resistant to rifampicin and ceftriaxone in spite of a similar increase in its generation time (from 24 ± 1 min to 27 ± 1 min). These results suggest that a decrease in the growth rate due to (p)ppGpp is not

sufficient to activate YcbB-mediated β -lactam resistance although we cannot rule out the possibility that the slightly decreased growth rate is required for resistance.

Table 1. Substitutions obtained by selection with β -lactams or rifampicin

Substitution in β or β' RNAP subunits ^b		Phenotype ^a		
		GT (min)	β -lac	Rif
Parental strain				
None	NA	24 \pm 1	S	S
Resistant mutants				
β-subunit				
Gly ⁴⁴⁹ Val	GGC \rightarrow GTC ⁽²⁾	27 \pm 1	R	R
Arg ⁴⁵¹ Cys	CGT \rightarrow TGT ^(1; 2)	34 \pm 3	R	R
Thr ⁵⁶³ Pro	ACC \rightarrow CCC ^(1; 2; 3)	50 \pm 3	R	R
Gly ⁵⁷⁰ Ser	GGT \rightarrow AGT ⁽²⁾	36 \pm 3	R	R
Pro ¹⁵³ Ileu	CCG \rightarrow CTG ⁽²⁾	ND	R	S
Leu ⁴²⁰ Arg	CTG \rightarrow CGG ⁽²⁾	37 \pm 1	R	S
His ⁴⁴⁷ Leu	CAC \rightarrow CTC ⁽¹⁾	48 \pm 3	R	S
His ⁵⁵¹ Pro	CAC \rightarrow CCC ⁽²⁾	34 \pm 2	R	S
Gln ¹⁴⁸ Leu	CAG \rightarrow CTG ⁽³⁾	28 \pm 2	S	R
Gln ¹⁴⁸ Arg	CAG \rightarrow CGG ⁽³⁾	28 \pm 2	S	R
Leu ¹⁴⁹ Arg	CTG \rightarrow CGG ⁽³⁾	28 \pm 3	S	R
Ile ⁵⁷² Leu	ATC \rightarrow CTC ⁽³⁾	28 \pm 2	S	R
β'-subunit				
Ala ¹¹⁴⁷ Pro	GCA \rightarrow CCA ⁽²⁾	ND	R	R
Gly ³³³ Asp	GGT \rightarrow GAT ⁽²⁾	40 \pm 3	R	S
Leu ¹¹⁴⁴ Pro	CTC \rightarrow CCG ⁽²⁾	ND	R	S
Gly ¹³⁰⁸ Asp	GGT \rightarrow GAT ⁽¹⁾	ND	R	S

^a GT, generation time, β -lac, β -lactams, Rif, rifampicin. Mutants were either co-resistant to mecillinam and ampicillin (R) or susceptible to both drugs (S).

^b Amino acid substitutions and the corresponding modifications in codons are indicated. Mutants were selected on ampicillin plus IPTG⁽¹⁾, mecillinam⁽²⁾, or rifampicin⁽³⁾.

NA, not applicable, ND, not determined.

YcbB-mediated β -lactam resistance is controlled by only one of the two RNAP (p)ppGpp binding sites. X-ray crystallography of the RNAP holoenzymes identified two (p)ppGpp binding sites located at the interface between the β' and the ω subunits (site 1) and between the β' subunit and the transcription factor DksA (site 2)⁴. Since the alarmone does not bind to site 1 or 2 in the absence of the ω subunit or DksA, respectively, we independently deleted the corresponding

genes (*rpoZ* and *dksA*) in strain BW25113 $\Delta relA$ pKT2(*ycbB*) pKT8(*relA'*). Deletion of *dksA* but not *rpoZ* abolished expression of β -lactam resistance (Fig. 3A). Thus, YcbB-mediated β -lactam resistance required binding of the alarmone to site 2 but not to site 1. In agreement with this notion, the RNAP substitutions enabling β -lactam resistance in the (p)ppGpp⁰ background were clustered at the vicinity of site 2 (Fig. 3B). Together, these results indicate that YcbB-mediated β -lactam resistance requires a modulation of RNAP activity mediated by binding of the alarmone to site 2 or by modification of residues in RNAP subunits that mimic the effect of alarmone binding to this site.

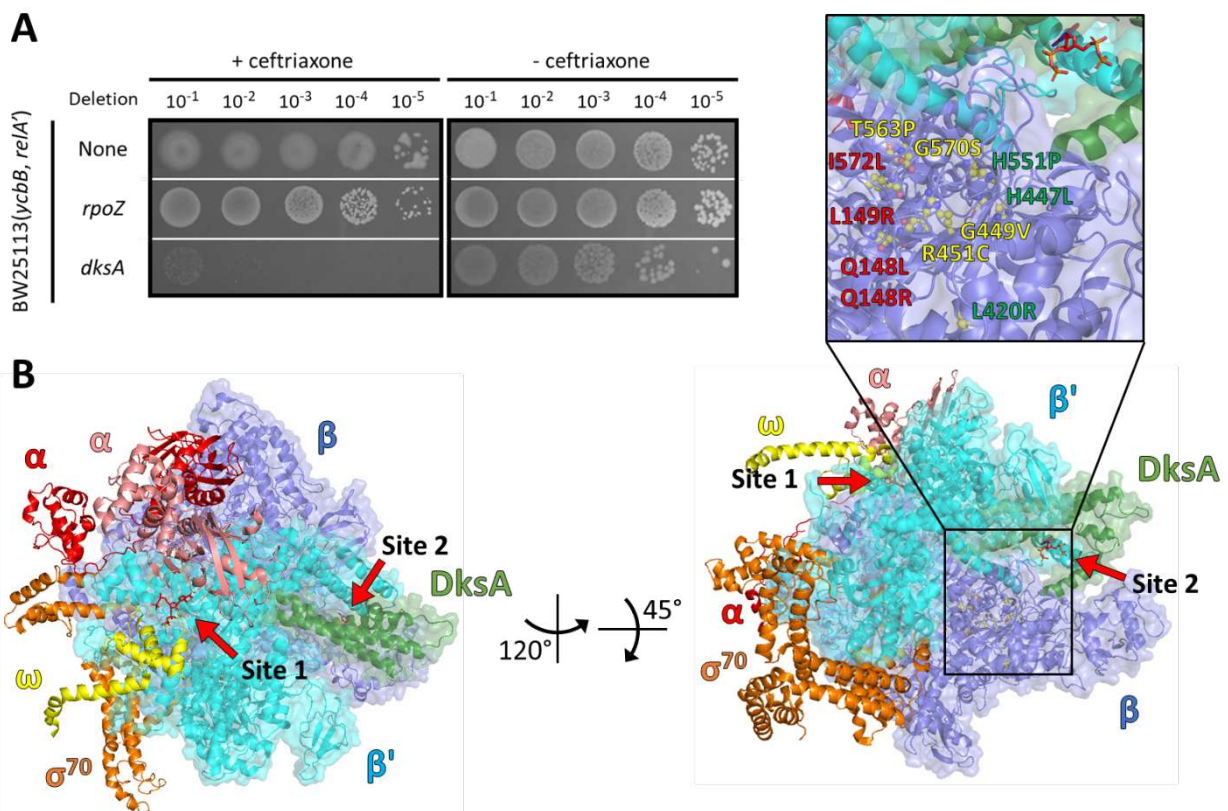


Figure 3. RNAP-dependent (p)ppGpp activation of β -lactam resistance requires binding to site 2. (A) Plating efficiency of BW25113 $\Delta relA$ pKT2(*ycbB*) pKT8(*relA'*) and its derivatives obtained by individual deletion of the *rpoZ* or *dksA* genes. Growth was tested in the presence of ceftriaxone at 8 μ g/ml (+ ceftriaxone) or in the absence of the drug (- ceftriaxone) on BHI agar plates supplemented with 40 μ M IPTG and 1% L-arabinose for induction of *ycbB* and *relA'*, respectively. (B) Localization of amino acid substitutions conferring β -lactam and rifampicin resistance in the RNAP holoenzyme (PDB entry 5VSW). Substitutions conferred resistance to β -lactams only (green), to rifampicin only (red), or to both antibiotics (yellow). The ppGpp alarmone is depicted in red in the two binding sites.

Gene regulation by alternative sigma factors does not activate YcbB-mediated β -lactam resistance. The various effects of (p)ppGpp on gene transcription include the recruitment of alternative sigma factors by RNAP leading to increased transcription of specific sets of genes (Fig.

1)^{11,12}. A hypothesis to explain the role of (p)ppGpp in the activation of YcbB-mediated β -lactam resistance could be the requirement of increased transcription of a subset of genes potentially expressed under the control of alternative sigma factors. Four of these six sigma factors were directly evaluated by gene deletion since they are dispensable for growth in *E. coli*. Derivatives of BW25113 $\Delta relA$ pKT2(*ycbB*) pKT8(*relA'*) obtained by independent deletion of genes *rpoN*, *rpoS*, *rpoF*, or *fecI*, encoding the unessential sigma factors σ^N (σ^{54}), σ^S (σ^{38}), σ^F (σ^{28}), and σ^{FecI} (σ^{19}), respectively, were resistant to ceftriaxone upon induction of *ycbB* by IPTG and *relA'* by L-arabinose (Supplementary Table S1). These results suggest that activation of YcbB-mediated β -lactam resistance does not require the control of gene expression through the unessential sigma factors σ^N , σ^S , σ^F , and σ^{FecI} . Two of the six alternative sigma factors, σ^H (σ^{32}) and σ^E (σ^{24}), could not be evaluated by gene deletion since they are encoded by essential genes (*rpoH* and *rpoE*, respectively). To address this bottleneck, we investigated the impact of overexpressing *rpoH* and *rpoE* by cloning these genes under the control of the L-arabinose-inducible P_{araBAD} promoter (of the plasmid vector pHV7) since overproduction of σ^H or σ^E can compete with the vegetative sigma factor σ^D for the RNAP core enzyme and mimic the (p)ppGpp-dependent increased affinity^{13–15}. The resulting plasmids were independently introduced into the BW25113 $\Delta relA \Delta spoT$ pKT2(*ycbB*) strain to test the emergence of β -lactam resistance. Overexpression of *rpoH* or *rpoE* did not bypass the requirement of (p)ppGpp for YcbB-mediated β -lactam resistance (Supplementary Table S1). Together, these results strongly suggest that (p)ppGpp-mediated activation of β -lactam resistance does not proceed by the modulation of gene expression regulated by alternative sigma factors.

Table S1. YcbB-mediated β -lactam resistance does not rely on the recruitment of a specific alternative sigma factor

Host	Plasmid	Inducers ^b	Inhibition zones (mm) ^a		
			Mec	Amp	Cro
BW25113 $\Delta relA$					
	pKT2(<i>ycbB</i>) pKT8(<i>relA'</i>)	None	20	18	34
		IPTG + Ara	< 6	< 6	15
BW25113 $\Delta relA \Delta rpoN$					
	pKT2(<i>ycbB</i>) pKT8(<i>relA'</i>)	IPTG + Ara	< 6	< 6	16
BW25113 $\Delta relA \Delta rpoS$					
	pKT2(<i>ycbB</i>) pKT8(<i>relA'</i>)	IPTG + Ara	< 6	< 6	15

BW25113 $\Delta relA \Delta rpoF$					
pKT2(<i>ycbB</i>) pKT8(<i>relA'</i>)	IPTG + Ara	< 6	< 6	15	
BW25113 $\Delta relA \Delta fecI$					
pKT2(<i>ycbB</i>) pKT8(<i>relA'</i>)	IPTG + Ara	< 6	< 6	14	
BW25113 $\Delta relA \Delta spoT$					
pKT2(<i>ycbB</i>) pHV7 ^c	IPTG + Ara	31	24	40	
BW25113 $\Delta relA \Delta spoT$					
pKT2(<i>ycbB</i>) pHV17(<i>rpoH</i>)	IPTG + Ara	32	26	43	
BW25113 $\Delta relA \Delta spoT$					
pKT2(<i>ycbB</i>) pHV18(<i>rpoE</i>)	IPTG + Ara	31	25	41	

^a The diameter of inhibition zones was determined by the disk diffusion assay around disks containing 10 μ g mecillinam (Mec), 10 μ g ampicillin (Amp), or 30 μ g ceftriaxone (Cro).

Data are the medians from three experiments.

^b The *ycbB* gene carried by plasmid pKT2 was induced with 40 μ M IPTG. The *relA'*, *rpoH*, and *rpoE* genes carried by plasmids pKT8, pHV17, and pHV18, respectively, were induced with 1% L-arabinose (Ara).

^c pHV7 is the vector used for construction of pKT8(*relA'*), pHV17(*rpoH*), and pHV18(*rpoE*).

Increased production of DksA bypasses the requirement of (p)ppGpp for YcbB-mediated β -lactam resistance. The ASKA library is an ordered collection of *E. coli* strains harboring plasmids carrying each individual gene of *E. coli* under the control of an IPTG-inducible promoter¹⁶. To evaluate whether overexpression of any of these genes could bypass the (p)ppGpp requirement for resistance, the pool of ASKA plasmids was introduced into BW25113 $\Delta relA \Delta spoT$ pHV63zeo(*ycbB*) and transformants were selected on agar plates containing either ceftriaxone and L-arabinose (for induction of *ycbB*) or mecillinam. For each selection, genes carried by the ASKA plasmids were induced by four IPTG concentrations (0, 20, 60 or 180 μ M). For both the ceftriaxone and mecillinam selections, approximately 200 transformants were obtained with IPTG at 180 μ M but not with the lower concentrations (20 and 60 μ M) or in the absence of the inducer. Plasmids were extracted from 20 ceftriaxone- and 20 mecillinam-resistant transformants and Sanger sequencing of a portion of their inserts revealed the presence of the *dksA* gene in all of them. This result showed that overexpression of *dksA* bypasses the requirement of (p)ppGpp for both YcbB-mediated β -lactam resistance and mecillinam resistance.

Decreased rRNA transcription bypasses the requirement of (p)ppGpp for YcbB-mediated β -lactam resistance. Binding of (p)ppGpp or DksA to RNAP results in decreased rRNA transcription

due to destabilization of the open complexes formed by RNAP with the P1 promoters of the seven *rrn* operons¹⁷⁻¹⁹. This common effect of (p)ppGpp and DksA on RNAP prompted us to determine whether a reduced synthesis of rRNAs results in β -lactam resistance. The CRISPR interference (CRISPRi) approach was used to downregulate the transcription of multiple *rrn* operons at once (Fig. 4A)²⁰. To guide dCas9 on the *rrn* operons, we independently cloned in the pFR56 plasmid four different sgRNAs targeting (i) 23S rRNA genes *rrlA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *G*, and *H* (*rrl7*), (ii) 23S rRNA genes *rrlB*, *E*, and *G* (*rrl3*), and (iii) two control sequences without homology in the *E. coli* genome (*ctrl1* and *ctrl2*)²¹. In these plasmids, the sgRNAs are constitutively transcribed whereas *dcas9* expression is under the control of the DAPG-inducible P_{hif} promoter. The resulting plasmids were independently introduced into the BW25113 Δ *relA* Δ *spoT* pKT2(*ycbB*) strain. Expression of *dcas9* by DAPG was toxic for sgRNA-*rrl7*, led to ceftriaxone resistance for sgRNA-*rrl3*, and had no effect for sgRNA-*ctrl1* or sgRNA-*ctrl2* (Fig. 4B). These results indicate that the level of transcription of the rRNAs was successfully modulated by the CRISPRi approach. Downregulation of three of the seven 23S rRNA *rrl* genes was sufficient both for mecillinam resistance (data not shown) and for YcbB-mediated ceftriaxone resistance in the absence of (p)ppGpp (Fig. 4). These observations identified the primary role of the alarmone in β -lactam resistance as a reduction in the number of ribosomes triggered by reduced transcription of rRNAs.

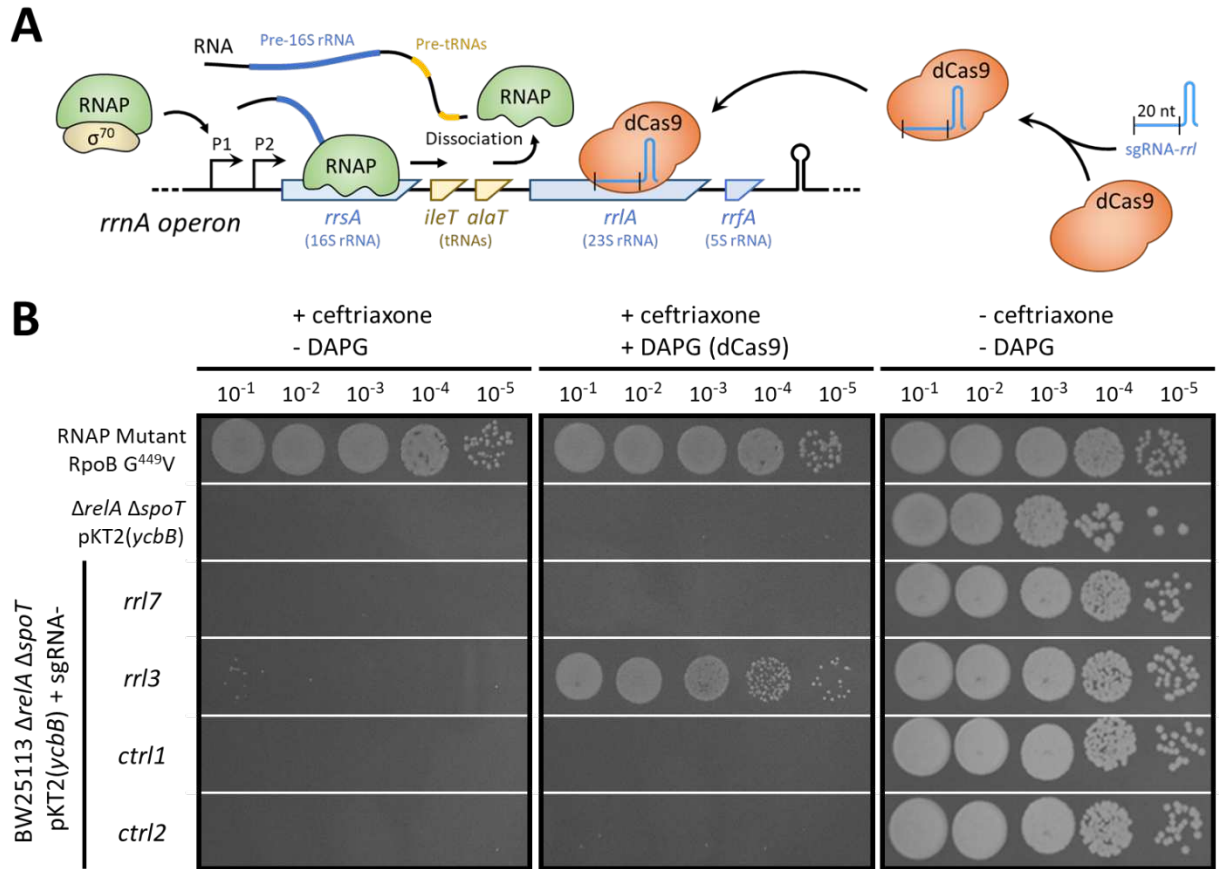


Figure 4. Lowering rRNA transcription bypasses the requirement of (p)ppGpp for β -lactam resistance. (A) Schematic representation of the CRISPR interference approach used to decrease expression of several *rrn* operons at once. The *rrnA* operon is displayed as an example. Dead Cas9 (dCas9) associates to the single guide RNA (sgRNA) and binds to the chromosomal target (a sequence within the 23S rRNA gene *rrlA*). The elongating RNAP that encounters dCas9 dissociates from the DNA matrix, leading to downregulation of the targeted gene. (B) Plating efficiency of the RpoB G⁴⁴⁹V mutant (positive control), the parental strain BW25113 Δ *relA* Δ *spoT* pKT2(*ycbB*) (negative control) and its derivatives harboring plasmids encoding dCas9 under the control of the DAPG-inducible P_{hif} promoter and four sgRNAs under the control of a constitutive promoter. These sgRNAs targeted seven (*rrl7*) or three (*rrl3*) of the seven of the 23S rRNA genes. The remaining sgRNAs, *ctrl1* and *ctrl2*, do not target any sequence in the *E. coli* chromosome²¹. Growth was tested in the presence of ceftriaxone at 8 μ g/ml (+ ceftriaxone) or in the absence of the drug (- ceftriaxone). Induction of the *dcas9* gene was performed with 50 μ M DAPG. BHI agar plates contained 40 μ M IPTG for induction of *ycbB*. In the absence of ceftriaxone, induction of *rrl7* by DAPG prevented growth BW25113 Δ *relA* Δ *spoT* pKT2(*ycbB*) (data not shown). This was not observed for the other sgRNAs.

Overproduction of endopeptidases enable YcbB-mediated β -lactam resistance. Lai and colleagues showed that production of the endopeptidase MepS stimulates peptidoglycan polymerization by class A PBPs thereby contributing to mecillinam resistance in the absence of (p)ppGpp overproduction²². This prompted us to investigate the role of the eight endopeptidases of *E. coli* in YcbB-mediated β -lactam resistance. The endopeptidase genes were independently

cloned under the control of the L-arabinose-inducible P_{araBAD} promoter of the vector pHV7 and introduced into the BW25113 $\Delta relA$ pKT2(*ycbB*) strain. The tested antibiotics included mecillinam and aztreonam that specifically inactivate class B PBP2 (elongasome) and class B PBP3 (divisome), respectively, and the broad spectrum ceftriaxone, which inactivates all D,D-transpeptidases. Two endopeptidases (MepH and PBP4) had no impact on β -lactam resistance (Fig. 5). Four endopeptidases restored full (MepK) or partial (MepM, PBP7, and AmpH) growth of BW25113 $\Delta relA$ pKT2(*ycbB*) in the presence of the selective PBP2 inhibitor (mecillinam). The two remaining endopeptidases restored full (MepS) or partial (MepA) growth in the presence of all three β -lactams. Together, these data showed that increased endopeptidase activity can bypass the requirement of (p)ppGpp for the expression of YcbB-mediated β -lactam resistance.

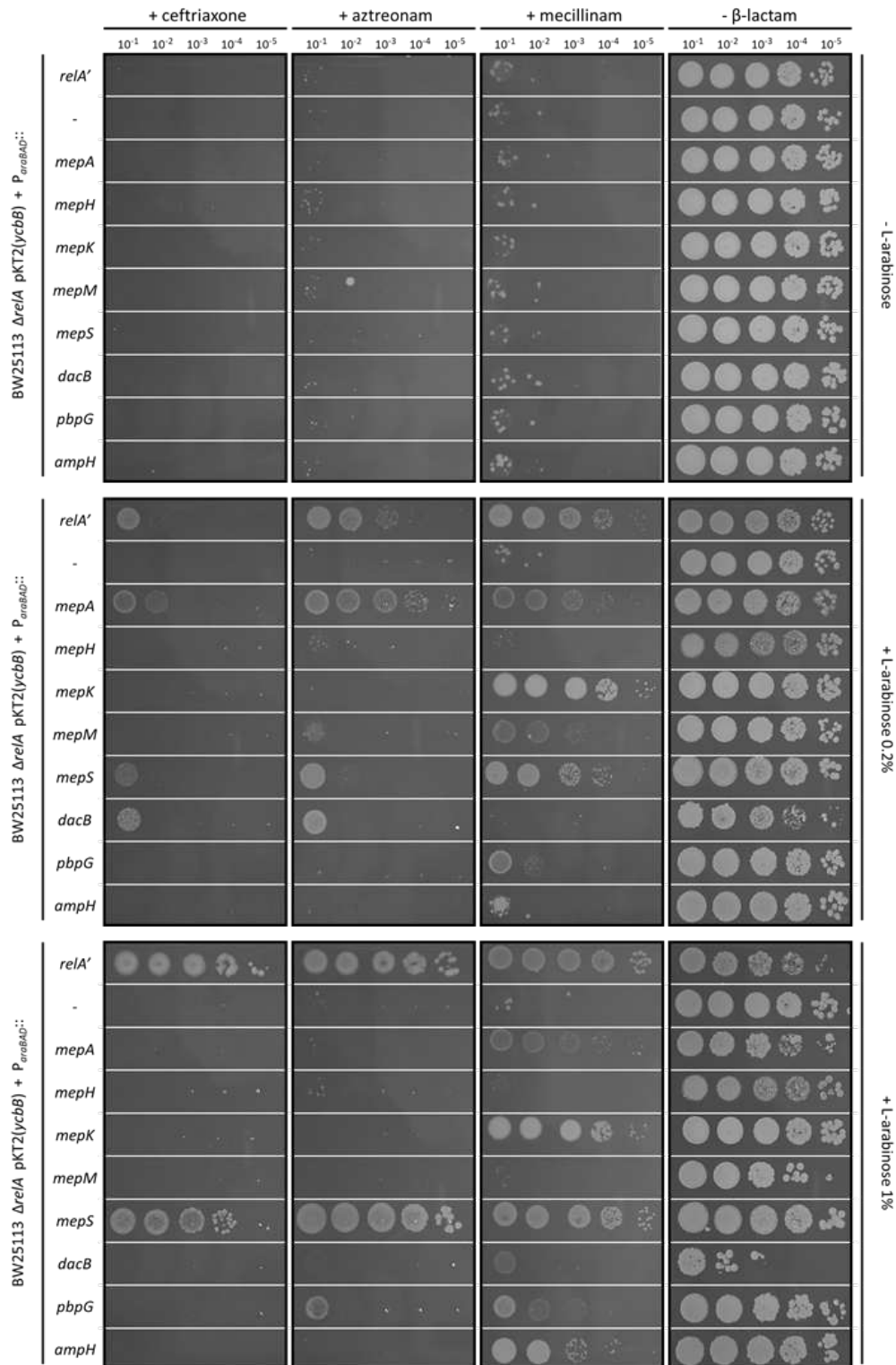


Figure 5. Overproduction of endopeptidases bypasses the requirement of (p)ppGpp for YcbB-mediated β-lactam resistance. Plating efficiency of BW25113 $\Delta relA$ pKT2(*ycbB*) harboring the pHV7 vector or derivatives harboring *relA'* (pKT8) or each of the eight endopeptidase genes under the control of the L-arabinose inducible P_{araBAD} promoter. β-lactams were tested at 8 μg/ml (ceftriaxone and aztreonam) or 16 μg/ml (mecillinam). BHI agar plates contained 40 μM IPTG for induction of *ycbB*. Induction of *relA'* or endopeptidase genes was performed with L-arabinose at 0.2 or

1%. The use of two concentrations of inducer was mandatory since high-level enzyme production was either required for growth in the presence of β -lactams or toxic depending upon the endopeptidase/ β -lactam combination under consideration.

DISCUSSION

In this study, we aimed at identifying the role of the pleiotropic (p)ppGpp alarmone in the expression of YcbB-mediated β -lactam resistance. High-level production of (p)ppGpp did not alter the structure of peptidoglycan (Fig. 2; Supplementary Fig. S1). This was observed both in the absence or presence of induction of the *ycbB* L,D-transpeptidase-encoding gene. These results strongly suggest that the alarmone does not directly modulate the activity or production of enzymes that act as partners of YcbB for effective formation of 3 \rightarrow 3 cross-links.

Substitutions affecting the β or β' subunit of the RNA polymerase (RNAP) bypassed the requirement of (p)ppGpp overproduction for YcbB-mediated β -lactam resistance (Table 1). This formally excluded the possibility that expression of β -lactam resistance required a direct interaction of the alarmone with other targets than the RNAP. We postulated that the role of the alarmone was indirect and involved a modulation of the transcription of a subset of the *ca.* 750 genes previously identified by transcriptomic analyses as upregulated or downregulated in response to (p)ppGpp production³. The localization of the substitutions in the RNAP and the phenotypes associated with *dksA* overexpression or deletion revealed that the role of (p)ppGpp in YcbB-mediated β -lactam resistance requires binding of the alarmone to one of the two RNAP binding sites (site 2; Fig. 3). Surprisingly, a subset of the RNAP amino acid substitutions identified in our study conferred cross-resistance to β -lactams and rifampicin despite the absence of similarity in the structure and mode of action of these drugs (Table 1). This observation suggests that mutations conferring rifampicin resistance may modulate the expression of specific genes.

Several approaches were used to identify a putative subset of genes that would be essential for YcbB-mediated β -lactam resistance among the *ca.* 750 genes regulated by the (p)ppGpp alarmone. Positive selection with the ASKA collection only retrieved the plasmid encoding DksA. This result indicates that the essential role of the alarmone in resistance does not imply the upregulation of a single gene. Likewise, negative results were obtained by considering subsets of

genes expressed under the control of alternative sigma factors (Supplementary Table S1). We had initially considered this possibility since the alarmone is known to reprogram gene expression by stimulating the recruitment of alternative sigma factors^{11,12}. We then considered the possibility that the alarmone acted by downregulating the transcription of ribosomal RNAs, thereby decreasing the number of ribosomes per cell. This is a well-documented effect of (p)ppGpp and DksA that act by destabilizing the transcription initiation complex^{1,17}. The CRISPR interference approach established that downregulation of three of the seven rRNA operons bypasses the requirement of (p)ppGpp for YcbB-mediated β -lactam resistance (Fig. 4). Together, these results indicate that the role of the alarmone does not involve modulation of the expression of specific genes related to peptidoglycan metabolism, as initially postulated, but directly depends upon a reduction of the number of ribosomes per cell.

The link between a reduced number of ribosomes per cell and the expression of β -lactam resistance is provided by a recent model of the mode of action of β -lactams, which is supported by several investigations²³⁻²⁹. This model proposes that the bactericidal β -lactams kill bacteria by both lytic and non-lytic mechanisms. Defects in peptidoglycan cross-linking that compromise the osmotic barrier are thought to result in lytic death. Alternatively, inhibition of D,D-transpeptidases by β -lactams uncouples the transglycosylation and cross-linking reactions resulting in an energy-depleting futile cycle of peptidoglycan synthesis and degradation²⁹. This is associated with the dysregulation of the energy metabolism and an increased protein synthesis rate, which ultimately leads to non-lytic death due to the accumulation of reactive oxygen species^{27,28}. Our results support this model and indicate that the alarmone can limit these effects by preventing the burst in protein synthesis that contributes to energy starvation. This is required for YcbB-mediated β -lactam resistance since the futile cycle persists in these conditions. Indeed, inactivation of D,D-transpeptidases by β -lactams results in the accumulation of uncross-linked glycan chains that are only partially used by YcbB for peptidoglycan synthesis^{30,31}. This model is also supported by our observation that overproduction of endopeptidases bypasses the requirement of (p)ppGpp for resistance (Fig. 5). By hydrolyzing peptidoglycan cross-links, endopeptidases facilitate insertion of glycan strands in the expanding peptidoglycan network by the class A PBPs. The net result is a reduction in the futile cycle at the origin of non-lytic bacterial killing by β -lactams. In this context,

the class A PBP1b, which forms a complex with YcbB *in vitro* and is essential for the β -lactam resistance mechanism, could have a major contribution in peptidoglycan polymerization and reduction of the futile cycle^{7,32}. In conclusion, our analysis provides a rational explanation for the double requirement of YcbB and (p)ppGpp for β -lactam resistance as YcbB prevents the lytic effect by promoting peptidoglycan cross-linking whereas (p)ppGpp protects the bacterium from the non-lytic effect by limiting the number of ribosomes and protein synthesis.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids, and growth conditions. The characteristics and origin of plasmids and strains used in the study are listed in Supplementary Table S2. Bacteria were grown at 37 °C in brain heart infusion (BHI; Difco) agar or broth with aeration (shaking at 180 rpm). Kanamycin at 50 μ g/ml was used for selection of transductants carrying the Km^R cassette obtained from the Keio collection³³. The growth media were systemically supplemented with drugs to counter-select plasmid loss: 10 μ g/ml tetracycline for plasmid pHV6 and derivatives, 20 μ g/ml chloramphenicol for pHV7 and derivatives and the derivatives of pFR56, 25 μ g/ml zeocin for pHV63zeo. Induction of the P_{trc}, P_{araBAD}, and P_{hlf} promoters was performed with isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), L-arabinose, and 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), respectively. Plasmids constructed in this study were obtained by using NEBuilder HiFi DNA assembly (New England Biolabs) method, unless otherwise specified. Deletions of specific genes were obtained by P1 transduction of the Km^R cassette of selected mutants from the Keio collection^{33,34}. For multiple gene deletions, the Km^R cassette was removed by the FLT recombinase encoded by plasmid pCP20.

Preparation of sacculi. Bacteria were grown in BHI broth to the late exponential phase, *i.e.* to an OD_{600nm} greater than 1.0 (*ca.* 6 h at 37 °C under agitation). Ten μ l of the resulting bacterial suspensions were plated on BHI agar supplemented with inducers (40 μ M IPTG and 1% L-arabinose) and drugs (10 μ g/ml tetracycline and 20 μ g/ml chloramphenicol). For each replicate, 5 BHI agar plates were used in order to obtain a sufficient amount of bacteria. Plates were incubated for 16 h at 37 °C. Bacteria were harvested in two steps by scrapping each plate with 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2 followed by an additional wash of the plate with 1 ml of PBS. Bacteria

were boiled in 0.5 x PBS supplemented with 4% sodium dodecyl sulfate (SDS) in a final volume of 20 ml for 1 h. Sacculi were harvested by centrifugation (20,000 x *g* for 20 min at 20 °C), washed five times with 20 ml of water, resuspended in 1 ml of 20 mM Tris-HCl pH 7.5, and incubated with 100 µg/ml pronase at 37 °C for 16 h. Sacculi were washed five times with 1 ml of water, resuspended in 1 ml of 20 mM sodium phosphate pH 8.0 and incubated with 100 µg/ml trypsin at 37 °C for 16 h. Sacculi were washed five times with 1 ml water, boiled for 5 min, collected by centrifugation, resuspended in 300 µl of water, and stored at -20 °C.

Peptidoglycan analysis. Ten µl of purified sacculi were digested with 120 µM lysozyme in 40 mM Tris-HCl pH 8.0 at 37 °C for 16 h. Insoluble material was removed by centrifugation at 12,000 rpm in a microcentrifuge for 10 min and the soluble fraction containing muropeptides was reduced with sodium borohydride in 125 mM borate buffer pH 9.0 for 1 h at room temperature. Phosphoric acid was used to adjust the pH to 4.0. Muropeptides were separated by *rp*HPLC in a C18 column (Hypersil GOLD aQ; 250 x 4.6 mm; 3 µm, Thermo Scientific) at a flow rate of 1 ml/min with a linear gradient (0 to 20%) applied between 10 and 60 min (buffer A, TFA 0.1%; buffer B, acetonitrile 99.9%, TFA 0.1%, v/v). Absorbance was monitored at 205 nm and fractions were collected, lyophilized, resuspended in water and analyzed by mass spectrometry. Mass spectra were obtained on a Bruker Daltonics maXis high-resolution mass spectrometer (Bremen, Germany) operating in the positive mode (Analytical Platform of the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France). Mass spectral data were explored using mineXpert²³⁵.

Mutant selection, phenotype analysis and whole-genome sequencing. *E. coli* BW25113 $\Delta relA \Delta spoT$ pJEH12(*ycbB*) was streaked for isolated colonies on agar plates containing 10 µg/ml tetracycline to counter-select loss of plasmid pJEH12(*ycbB*). The selection procedure was independently carried out starting with independent colonies. A fresh colony of *E. coli* BW25113 $\Delta relA \Delta spoT$ pJEH12(*ycbB*) was inoculated in 5 ml of BHI broth supplemented with 10 µg/ml tetracycline. Bacteria were grown overnight at 37 °C with shaking (180 rpm). One hundred µl of overnight culture were plated on BHI agar supplemented with 32 µg/ml ampicillin and 50 µM IPTG, 50 µg/ml mecillinam, or 16 µg/ml rifampicin. Plates were incubated overnight at 37 °C. Determination of mutant frequency was determined by dividing the number of resistant mutants obtained to the CFU plated. Each mutant presented in this work came from independent

experiments. Activation of YcbB-mediated β -lactam resistance in selected mutants was confirmed using the disk diffusion assay in BHI agar supplemented or not with 50 μ M IPTG. Disks were loaded with 10 μ g of mecillinam, 10 μ g of ampicillin, 30 μ g of ceftriaxone, 10 μ g of imipenem, 30 μ g of tetracycline or 30 μ g of rifampicin. Activation of YcbB-mediated β -lactam resistance was determined based on growth around the diffusion diameter of ampicillin and ceftriaxone in absence or presence of IPTG as previously described, and resistance to rifampicin was determined based on growth around the diffusion diameter of rifampicin⁷. Resistance to tetracycline confirmed the presence of pJEH12(*ycbB*) and susceptibility to imipenem was used as a control since this drug inhibits the YcbB L,D-transpeptidase. To identify the mutations, 5 ml of BHI broth containing 10 μ g/ml tetracycline was inoculated with a single colony of each selected mutants and genomic DNA was extracted (Wizard DNA extraction kit, Promega). Genomic DNA was either sequenced by paired-end joining Illumina (Novogene) or used for PCR amplification of the *rpoB* gene followed by Sanger sequencing. For Illumina sequencing, identification of the mutations was performed with the *breseq* pipeline³⁶.

Determination of generation time. For each mutant tested a fresh colony was inoculated in 1 ml BHI broth. Fifty μ l of the suspension were inoculated in 150 μ l BHI broth in 5 wells of a 96-well plate. Plates were incubated at 37°C overnight with agitation. Optical density at 600 nm was measured with a plate-reader (Tecan Infinite 200 pro). For three biological replicates, each corresponding to five technical replicates, generation time (G) was determined using formula $G = \ln(\mu) / 2$ where μ corresponds to the slope of the linear part of the function $\ln(\text{OD}_{600\text{nm}}) = f(\text{time, min})$.

Plating efficiency assay. Bacteria were grown to the late exponential phase, *i.e.* to an $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 1.0 to 4.0 (*ca.* 6 h at 37 °C with vigorous shaking). The $\text{OD}_{600\text{nm}}$ was adjusted to 1.0 and 10-fold dilutions (10^{-1} to 10^{-5}) were prepared in BHI broth. Five μ l of the resulting bacterial suspensions were spotted on BHI agar plates supplemented with inducers and drugs as indicated in the legend to figures. Plates were imaged after 16 h (or 24 h for plates containing ceftriaxone) of incubation at 37 °C. Data shown in the figures are representatives of at least two biological repeats.

Identification of genes that bypass the requirement of (p)ppGpp. To identify genes whose overexpression might bypass the requirement of (p)ppGpp in YcbB-mediated β -lactam resistance or mecillinam resistance, a pooling mixture of the 6His-tagged genes from the ASKA plasmid library was transformed in BW25113 $\Delta relA \Delta spoT$ pHV63zeo(*ycbB*)¹⁶. The resulting bacterial suspension was plated on BHI agar supplemented with 8 μ g/ml ceftriaxone plus 1% L-arabinose to induce expression of *ycbB*, or 50 μ g/ml mecillinam, and in the absence or presence of IPTG at 20, 60 or 180 μ M to induce expression of the ASKA plasmid-encoded genes. The media systematically contained chloramphenicol to counter-select loss of the ASKA plasmids. Plates were incubated overnight at 37 °C and transformants were obtained only with 180 μ M IPTG. Twenty transformants selected with ceftriaxone plus L-arabinose and 20 transformants selected with mecillinam were isolated and their resistance phenotype confirmed. ASKA plasmids that produced resistant clones under the selective pressure of β -lactams were extracted and Sanger sequencing revealed in the 40 transformants the presence of the ASKA plasmid carrying the *dkSA* gene.

Table S2. Characteristics and origin of the strains and plasmids used in this study

Strain	Characteristics	Origin
BW25113	$\Delta(araD-araB)567 \Delta(rhaD-rhaB)568$ $\Delta lacZ4787 (::rrnB-3) hsdR514 rph-1$	Baba, T. <i>et al.</i> ³³
(p)ppGpp ⁰	BW25113 $\Delta relA \Delta spoT$	This study
Plasmid	Characteristics	Origin
<i>Vectors</i>		
pHV6	Tet ^R P _{trc} <i>lacI</i> <i>oriV</i> CloDF13	Voedts, H. <i>et al.</i> ³⁰
pHV7	Cm ^R P _{araBAD} <i>araC</i> <i>oriV</i> p15A	Voedts, H. <i>et al.</i> ³⁰
pFR56	Cm ^R P _{hif} <i>dcas9</i> <i>phIF</i> sgRNA <i>oriV</i> p15A	Rousset F. <i>et al.</i> ³⁰
<i>Recombinant plasmids for ycbB and relA' expression</i>		
pJEH12	pHV6 Ω <i>ycbB</i> <i>oriV</i> p15A	Hugonnet, J. E. <i>et al.</i> ⁷
pKT2	pHV6 Ω <i>ycbB</i>	Hugonnet, J. E. <i>et al.</i> ⁷
pKT8	pHV7 Ω <i>relA'</i>	Hugonnet, J. E. <i>et al.</i> ⁷
pHV63zeo	pHV6 Ω <i>ycbB</i> Zeo ^R	This study
<i>Recombinant plasmids for alternative sigma factors and endopeptidases expression</i>		
pHV17	pHV7 Ω <i>rpoH</i>	This study
pHV18	pHV7 Ω <i>rpoE</i>	This study
pHV55	pHV7 Ω <i>mepA</i>	Voedts, H. <i>et al.</i> ³⁰
pHV56	pHV7 Ω <i>mepH</i>	Voedts, H. <i>et al.</i> ³⁰
pHV57	pHV7 Ω <i>mepK</i>	Voedts, H. <i>et al.</i> ³⁰
pHV58	pHV7 Ω <i>mepM</i>	Voedts, H. <i>et al.</i> ³⁰
pHV59	pHV7 Ω <i>mepS</i>	Voedts, H. <i>et al.</i> ³⁰
pHV60	pHV7 Ω <i>dacB</i>	Voedts, H. <i>et al.</i> ³⁰

pHV61	pHV7 Ω <i>pbpG</i>	Voedts, H. <i>et al.</i> ³⁰
pHV62	pHV7 Ω <i>ampH</i>	Voedts, H. <i>et al.</i> ³⁰
<i>Recombinant plasmids for CRISPR interference</i>		
pHV135	pFR56 Ω sgRNA- <i>rrl7</i> (TTCCCATCGACTAGCCTTT)	This study
pHV136	pFR56 Ω sgRNA- <i>rrl3</i> (GATTCAGCTCCATCCGCGA)	This study
pHV137	pFR56 Ω sgRNA- <i>ctrl1</i> (CGACGTTGTGGCTCTAGTCG)	This study
pHV138	pFR56 Ω sgRNA- <i>ctrl2</i> (GATCGCTCTGCCATCTAGCA)	This study

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the French National Research Agency ANR ‘RegOPeps’ (grant ANR-19-CE44-0007 to JEH). HV is the recipient of a doctoral fellowship from Sorbonne-Université (ED 515, Complexité du Vivant). We thank A. Marie for technical assistance in the collection of mass spectra at the Plateau Technique de Spectrométrie de Masse Bio-Organique of the Muséum national d’Histoire Naturelle. We thank E. Maisonneuve for the kind gift of the pool of the ASKA plasmids. We thank Z. Edoos for proof-reading the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

HV: conception and design; acquisition, analysis, and interpretation of data; drafting and revising the article. MA and JEH: conception and design; analysis and interpretation of data; drafting and revising the article.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Irving, S. E., Choudhury, N. R. & Corrigan, R. M. The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020 194 **19**, 256–271 (2020).
2. Zhang, Y., Zborníková, E., Rejman, D. & Gerdes, K. Novel (p)ppGpp Binding and Metabolizing Proteins of *Escherichia coli*. *MBio* **9**, (2018).
3. Sanchez-Vazquez, P., Dewey, C. N., Kitten, N., Ross, W. & Gourse, R. L. Genome-wide effects on *Escherichia coli* transcription from ppGpp binding to its two sites on RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 8310–8319 (2019).
4. Ross, W. *et al.* ppGpp Binding to a Site at the RNAP-DksA Interface Accounts for Its Dramatic Effects on Transcription Initiation during the Stringent Response. *Mol. Cell* **62**, 811–823 (2016).
5. Garde, S., Chodiseti, P. K. & Reddy, M. Peptidoglycan: Structure, Synthesis, and Regulation. *EcoSal Plus* **9**, (2021).
6. Mainardi, J. L. *et al.* A novel peptidoglycan cross-linking enzyme for a β -lactam-resistant transpeptidation pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 38146–38152 (2005).
7. Hugonnet, J. E. *et al.* Factors essential for L,D-transpeptidase-mediated peptidoglycan cross-linking and β -lactam resistance in *Escherichia coli*. *Elife* **5**, (2016).
8. Vinella, D., D’Ari, R. & Bouloc, P. Penicillin binding protein 2 is dispensable in *Escherichia coli* when ppGpp synthesis is induced. *EMBO J.* **11**, 1493–1501 (1992).
9. Trinh, V., Langelier, M.-F., Archambault, J. & Coulombe, B. Structural Perspective on Mutations Affecting the Function of Multisubunit RNA Polymerases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 12–36 (2006).
10. Potrykus, K., Murphy, H., Philippe, N. & Cashel, M. ppGpp is the major source of growth rate control in *E. coli*. *Environ. Microbiol.* **13**, 563 (2011).
11. Sharma, U. K. & Chatterji, D. Transcriptional switching in *Escherichia coli* during stress and

- starvation by modulation of sigma activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 646–657 (2010).
12. Mauri, M. & Klumpp, S. A Model for Sigma Factor Competition in Bacterial Cells. *PLoS Comput. Biol.* **10**, e1003845 (2014).
 13. Dartigalongue, C., Missiakas, D. & Raina, S. Characterization of the *Escherichia coli* σ E Regulon. *J. Biol. Chem.* **276**, 20866–20875 (2001).
 14. Zhao, K., Liu, M. & Burgess, R. R. The Global Transcriptional Response of *Escherichia coli* to Induced σ 32 Protein Involves σ 32 Regulon Activation Followed by Inactivation and Degradation of σ 32 in Vivo. *J. Biol. Chem.* **280**, 17758–17768 (2005).
 15. Nonaka, G., Blankschien, M., Herman, C., Gross, C. A. & Rhodius, V. A. Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, σ 32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes Dev.* **20**, 1776 (2006).
 16. Kitagawa, M. *et al.* Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res.* **12**, 291–299 (2005).
 17. Paul, B. J. *et al.* DksA: A critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* **118**, 311–322 (2004).
 18. Potrykus, K. *et al.* Antagonistic Regulation of *Escherichia coli* Ribosomal RNA *rrnB* P1 Promoter Activity by GreA and DksA. *J. Biol. Chem.* **281**, 15238–15248 (2006).
 19. Magnusson, L. U., Gummesson, B., Joksimović, P., Farewell, A. & Nyström, T. Identical, independent, and opposing roles of ppGpp and DksA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**, 5193–5202 (2007).
 20. Qi, L. S. *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* **152**, 1173–1183 (2013).
 21. Rousset, F. *et al.* The impact of genetic diversity on gene essentiality within the *Escherichia coli* species. *Nat. Microbiol.* **2021** *63* **6**, 301–312 (2021).

22. Lai, G. C., Cho, H. & Bernhardt, T. G. The mecillinam resistome reveals a role for peptidoglycan endopeptidases in stimulating cell wall synthesis in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* **13**, e1006934 (2017).
23. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A. & Collins, J. J. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell* **130**, 797–810 (2007).
24. Foti, J. J., Devadoss, B., Winkler, J. A., Collins, J. J. & Walker, G. C. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science* **336**, 315–319 (2012).
25. Dwyer, D. J. *et al.* Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E2100–E2109 (2014).
26. Lobritz, M. A. *et al.* Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 8173–8180 (2015).
27. Lobritz, M. A. *et al.* Increased energy demand from anabolic-catabolic processes drives β -lactam antibiotic lethality. *Cell Chem. Biol.* **29**, 276-286.e4 (2022).
28. Kawai, Y. *et al.* Crucial role for central carbon metabolism in the bacterial L-form switch and killing by β -lactam antibiotics. *Nat. Microbiol.* **2019 410 4**, 1716–1726 (2019).
29. Cho, H., Uehara, T. & Bernhardt, T. G. Beta-Lactam Antibiotics Induce a Lethal Malfunctioning of the Bacterial Cell Wall Synthesis Machinery. *Cell* **159**, 1300–1311 (2014).
30. Voedts, H. *et al.* Role of endopeptidases in peptidoglycan synthesis mediated by alternative cross-linking enzymes in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **40**, e108126 (2021).
31. Atze, H. *et al.* Heavy isotope labeling and mass spectrometry reveal unexpected remodeling of bacterial cell wall expansion in response to drugs. *Elife* **11**, (2022).
32. Caveney, N. A. *et al.* Structural insight into YcbB-mediated beta-lactam resistance in *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* **10**, 1849 (2019).

33. Baba, T. *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, (2006).
34. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6640–6645 (2000).
35. Langella, O. & Rusconi, F. mineXpert2: Full-Depth Visualization and Exploration of MS n Mass Spectrometry Data. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **32**, 1138–1141 (2021).
36. Deatherage, D. E. & Barrick, J. E. Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. *Methods Mol. Biol.* **1151**, 165–188 (2014).

Discussion

1. Le rôle des endopeptidases dans la synthèse du peptidoglycane

L'essentialité des endopeptidases dans l'expansion du peptidoglycane était connue uniquement dans le contexte de la formation des ponts interpeptidiques de type 4→3 (Singh et al. 2012; Vollmer 2012). Dans l'article 1, nous avons montré que les endopeptidases sont également essentielles pour la synthèse d'un peptidoglycane réticulé par des ponts 3→3. Cela a été démontré par l'introduction de délétions multiples, par des expériences de complémentations fonctionnelles et par la mise en évidence des activités enzymatiques des endopeptidases purifiées. Nous avons montré qu'une seule endopeptidase parmi MepM, MepS, MepH et PBP7 suffisait à l'expansion d'un peptidoglycane 4→3, alors que MepM et MepK sont essentielles si les ponts sont de type 3→3. La nécessité de produire ces deux endopeptidases pour un peptidoglycane de type 3→3 est étonnante, et suggère fortement que MepM et MepK remplissent des fonctions bien distinctes. Des expériences complémentaires de microscopie non publiées montrent un épaissement important de la paroi de *E. coli* lorsque YcbB est produite dans une souche $\Delta mepK$. Par un mécanisme inconnu, l'épaississement de la paroi était systématiquement suivi de la lyse bactérienne, démontrant l'importance de MepK lorsque YcbB est produite. Ces résultats complémentaires pourraient suggérer que MepM est à l'origine de l'insertion des nouvelles chaînes glycanes reliées par YcbB et que MepK assure un contrôle de la qualité du peptidoglycane. Contrairement à la synthèse du peptidoglycane médiée par les PBP, nous avons vu que la réticulation du peptidoglycane par YcbB n'est pas couplée à la synthèse des chaînes glycanes par les glycosyltransférases. Cette absence de couplage pourrait être à l'origine de la production d'un polymère aberrant et toxique nécessitant l'activité de MepK pour éviter son accumulation. Alternativement, une étude récente basée sur des expériences de marquage du peptidoglycane avec des isotopes lourds et des analyses en spectrométrie de masse propose que MepK pourrait fonctionner en couplage avec YcbB. MepK hydrolyserait des ponts 3→3 dans le peptidoglycane préexistant afin de fournir des tiges tripeptides sélectivement utilisées comme accepteuses par YcbB en présence de β -lactamines (Atze et al. 2022). Dans l'article 1, nous avons également démontré l'existence d'une activité L,D-carboxypeptidase pour les enzymes MepH et MepS. Une étude récente a montré que l'insertion des OMP dans la membrane externe et le repliement de ces protéines médiés par le complexe BAM sont inhibés par les tiges tetrapeptides du peptidoglycane (Mamou et al. 2022). L'activité L,D-carboxypeptidase de MepH et MepS pourrait donc avoir un rôle dans la régulation spatio-temporelle de la synthèse des OMP en levant l'inhibition des complexes BAM par les tiges tetrapeptides.

2. Les β -lactamines agissent sur la biosynthèse de plusieurs composants de l'enveloppe

Le mode d'action des β -lactamines sur l'enveloppe bactérienne a été pendant longtemps considéré comme étant limité à une inhibition de la réticulation du peptidoglycane par les PBP empêchant la croissance bactérienne et pouvant conduire à une lyse si la fonction osmoprotectrice du peptidoglycane était compromise (Bush and Bradford 2016). Dans l'article 2, nous avons montré que l'impact des β -lactamines s'étend au-delà de la synthèse du peptidoglycane et touche l'enveloppe bactérienne dans son ensemble. En particulier, nous avons montré (i) que les β -lactamines bloquent l'ancrage de la lipoprotéine de Braun au peptidoglycane, et donc la formation du seul lien covalent entre la membrane externe et le peptidoglycane, (ii) que les β -lactamines accentuent la compétition entre synthèse du peptidoglycane et de la capsule pour un transporteur lipidique (undécaprényl) qui est commun à la translocation des sous-unités de ces deux polymères du cytoplasme vers le périplasme et (iii) que les β -lactamines affectent la stabilité de l'enveloppe en présence de détergent.

Historiquement, la membrane externe a été considérée comme une simple barrière de perméabilité alors que les propriétés mécaniques de l'enveloppe étaient exclusivement déterminées par le peptidoglycane souvent décrit comme un exosquelette. Des études récentes ont cependant remis en cause cette conception en démontrant que la membrane externe contribuait indépendamment du peptidoglycane aux propriétés mécaniques de l'enveloppe (Rojas et al. 2018; Sun et al. 2021). L'impact des β -lactamines sur l'ancrage de la membrane externe et sur l'intégrité de l'enveloppe reflète l'essentialité des LPS et ECA_{PGL} intacts pour la croissance en présence de ces antibiotiques. D'une façon plus générale, l'ensemble de ces résultats redémontrent la connexion étroite entre le peptidoglycane et la membrane externe dans la formation d'une enveloppe robuste protégeant efficacement les bactéries. Nos résultats montrent l'importance de prendre en considération l'effet de l'inhibition de la synthèse de l'un des deux composants sur l'autre.

3. Les β -lactamines augmentent la perméabilité de la membrane externe

Les β -lactamines sont des molécules hydrophiles qui ne peuvent pas atteindre le périplasme en passant directement à travers la membrane externe (Pagès, James, and Winterhalter 2008). Les β -lactamines utilisent donc les canaux aqueux formés par les porines insérées dans la membrane externe. Dans l'article

2, nous avons montré que la croissance en présence de β -lactamines impacte fortement la fonction de perméabilité de la membrane externe. Ceci a été démontré par l'hydrolyse du CPRG, un substrat chromogène de la β -galactosidase auquel la membrane externe est imperméable, ainsi que par une très forte augmentation de la sensibilité à plusieurs antibiotiques de haut poids moléculaires qui ne peuvent pas emprunter la voie des porines. L'effet des β -lactamines sur la perméabilité de la membrane externe implique que ces antibiotiques promeuvent indirectement leur propre entrée dans le périplasme, et que cet effet, *self-promoted uptake* ou pénétration auto-promue, pourrait avoir un rôle important dans l'efficacité des β -lactamines sur les bactéries didermes (Figure 27). La voie d'entrée des β -lactamines dans ces conditions n'est pas connue. Dans le cas des aminosides, l'antibiotique altère la fixation des ions Mg^{2+} aux LPS de la membrane externe favorisant ainsi leur propre passage à travers la membrane externe (Serio et al. 2018). Une fois dans le périplasme, le potentiel de membrane permettrait une pénétration limitée des aminosides dans le cytoplasme. Les quelques molécules atteignant le cytoplasme induiraient des erreurs de traduction et les protéines mal repliées qui en découlent pourraient déstabiliser la membrane interne, augmentant ainsi fortement la pénétration de l'antibiotique dans le cytoplasme et les erreurs de traduction. Concernant les β -lactamines, trois hypothèses pourraient rendre compte de l'augmentation auto-promue de la perméabilité de la membrane externe.

(i) Un premier élément de réponse est l'absence d'ancrage de la Lpp au peptidoglycane que nous avons identifiée en présence de ceftriaxone (article 2) et en présence d'ampicilline (résultats non publiés). L'inhibition des L,D-transpeptidases responsables de l'ancrage de la lipoprotéine de Braun par les β -lactamines n'a pas encore été étudiée *in vitro*. Les L,D-transpeptidases responsables de la formation des ponts de type 3 \rightarrow 3 chez *E. coli*, *M. tuberculosis*, *M. abscessus*, *E. faecium*, et *C. difficile* sont en général efficacement inactivées par les carbapénèmes, inefficacement par les céphalosporines, et non inhibées par les pénames (pénicillines) (Hugonnet et al. 2016; Sutterlin et al. 2018; Triboulet et al. 2013). Il reste donc à déterminer si les L,D-transpeptidases responsables de l'ancrage de la lipoprotéine de Braun présentent un profil d'inactivation particulier qui pourrait rendre compte de l'inhibition de l'ancrage de Lpp en présence de ceftriaxone et d'ampicilline. Alternativement, l'inhibition de l'ancrage de la Lpp par la ceftriaxone et l'ampicilline pourrait être indirecte s'il y a un couplage entre les LDT responsables de l'ancrage de la Lpp et d'autres enzymes potentiellement inhibées par les β -lactamines. Il pourrait s'agir de D,D-carboxypeptidases ou d'endopeptidases appartenant à la famille des PBP qui fourniraient les substrats tetrapeptides des L,D-transpeptidases. Enfin, une autre alternative pourrait être une diminution de la production de Lpp en présence de β -lactamines.

(ii) L'augmentation de la perméabilité de la membrane externe pourrait impliquer le couplage entre la synthèse du peptidoglycane et des OMP (Mamou et al. 2022). Les auteurs de cette étude ont montré que le complexe BAM d'insertion des OMP dans la membrane externe est inhibé par les tiges tetrapeptides. L'inhibition des D,D-carboxypeptidases de la famille des PBP par les β -lactamines entraîne une augmentation de la quantité de tiges pentapeptides dans le peptidoglycane (Hugonnet et al. 2016). L'accumulation de tiges pentapeptides en réponse à l'inhibition des D,D-carboxypeptidases par les β -lactamines pourrait désynchroniser la synthèse du peptidoglycane et des OMP et altérer *in fine* la perméabilité de la membrane externe.

(iii) L'augmentation de la perméabilité de la membrane externe pourrait résulter du stress oxydant provoqué par la fixation des β -lactamines aux PBP. Dans l'article 2, nous avons introduit le cycle futile induit par l'inhibition des PBP par les β -lactamines et ses conséquences sur les dépenses énergétiques inutiles et la formation de ROS (Cho et al. 2014; Kawai et al. 2019; Lobritz et al. 2022). Ces ROS pourraient réagir avec les constituants de la membrane externe, protéines et/ou lipides insaturés, et compromettre ainsi la barrière de perméabilité.

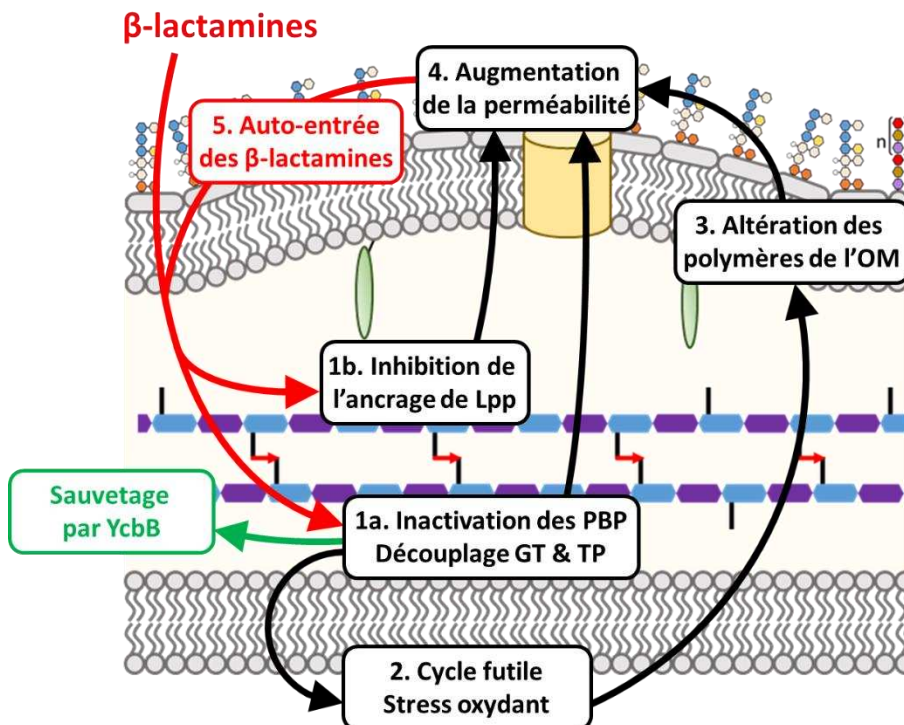


Figure 27. Modèle rendant compte de l'action des β -lactamines sur l'enveloppe de *Escherichia coli*.

Le modèle propose que les β -lactamines pénètrent la membrane externe par les porines. Une fois dans le périplasm, les β -lactamines inhibent l'activité D,D-transpeptidase des PBP ce qui entraîne le découplage des activités glycosyltransférases (GT) et transpeptidases (TP) (étape 1a). Par un mécanisme encore inconnu, les β -lactamines empêchent également l'ancrage de la lipoprotéine de Braun (Lpp) au

peptidoglycane (étape 1b). Le cycle futile de synthèse et de dégradation du peptidoglycane induit par l'inactivation des D,D-transpeptidases (étape 2) provoque un stress oxydant qui endommage les protéines et les lipides insaturés (étape 3). Nous proposons que la combinaison des effets des β -lactamines (étape 1a, 1b et 3) impacte la perméabilité de la membrane externe (étape 4) ce qui favorise davantage l'entrée des β -lactamines (étape 5).

4. L'activité glycosyltransférase de RodA est essentielle pour la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB

Chez *E. coli*, la synthèse latérale du peptidoglycane nécessite l'élongasome (Egan et al. 2020). RodA (protéine de la famille SEDS) et PBP2 (PBP de classe B) assurent respectivement les activités glycosyltransférase et D,D-transpeptidase de ce complexe. Dans l'article 2, nous avons montré que l'activité glycosyltransférase de RodA est nécessaire à la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB, et que l'activité D,D-transpeptidase de la PBP2 n'est pas nécessaire bien que cette protéine soit requise pour le fonctionnement de RodA. Ceci a été montré en supprimant sélectivement les activités D,D-transpeptidase de la PBP2 et glycosyltransférase de RodA sans altérer la formation du complexe multiprotéique de l'élongasome. Cela a été réalisé en introduisant des mutations ponctuelles dans les gènes correspondants. L'utilisation de l'approche CIRPSR-Cas9 a été déterminante pour le succès de cette expérience car elle permet d'introduire des mutations ponctuelles en une seule étape. Avant mon arrivée au laboratoire, les tentatives basées sur les approches de mutagenèse classiques reposant sur des échanges alléliques étaient restées sans succès, probablement parce que ces approches impliquent des effets polaires létaux liés à l'insertion de marqueurs de résistance.

Les résultats obtenus pour l'élongasome grâce à l'approche CRISPR-Cas9 permettent d'envisager de disséquer de la même manière l'essentialité des activités glycosyltransférase (FtsW, protéine SEDS) et D,D-transpeptidase (PBP3, PBP de classe B) du divisome, dans ce cas en présence d'une copie ectopique et inductible des gènes codant pour la PBP3 et FtsW puisque nous n'avons pas identifié de conditions pour lesquelles le divisome n'est pas essentiel. Ceci pourrait en particulier permettre de déterminer si FtsW alimente YcbB en chaînes glycanes pour former le septum. Ceci pourrait également permettre d'explorer le rôle de la PBP1b (PBP bi-fonctionnelle de classe A) qui est préférentiellement localisée au niveau du divisome et interagit *in vivo* avec la PBP3 (Bertsche et al. 2006; Typas et al. 2011). Pour un peptidoglycane réticulé par des ponts 3→3 par YcbB, la PBP1b pourrait être suffisante pour fournir les chaînes glycanes

nécessaires à la formation du septum. Dans ce cas, l'essentialité des composants du divisome pourraient principalement s'expliquer pour leur rôle dans la localisation fonctionnelle de la PBP1b.

5. Le (p)ppGpp active la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB en diminuant l'expression des ARNr

La résistance au mecillinam médiée par la production de (p)ppGpp a été découverte depuis 30 ans, mais le mode d'action du (p)ppGpp n'était pas connu (Vinella, D'Ari, and Bouloc 1992). L'identification de la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB en 2016 a démontré que le (p)ppGpp n'était pas seulement impliqué dans la résistance au mecillinam mais également à un large spectre de β -lactamines appartenant aux classes des pénames, céphèmes, et monobactames chez les souches produisant YcbB à un niveau élevé (Hugonnet et al. 2016). Comme pour la résistance au mecillinam dépendante du (p)ppGpp, le rôle du (p)ppGpp dans la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB n'était pas connu. Dans l'article 3, nous avons montré que des substitutions d'acides aminés localisées au site 2 de fixation du (p)ppGpp à la RNAP phénocopient l'effet du (p)ppGpp. La surproduction du facteur de transcription DksA reproduit aussi le phénotype médié par la surproduction du (p)ppGpp en accord avec les données de la littérature qui ont montré qu'une surproduction de DksA mime les effets de la fixation du (p)ppGpp à la RNAP sur la transcription des ARN ribosomiaux (ARNr) (Magnusson et al. 2007; Potrykus et al. 2006). L'effet de l'alarmone dans le mécanisme de résistance est donc indirect car il implique une modulation de la transcription de gènes cibles par la RNAP. Un effet direct impliquant une modulation de l'activité des enzymes cibles du (p)ppGpp, comme certaines enzymes impliquées dans le métabolisme des bases des acides nucléiques, n'a donc pas de rôle essentiel dans la résistance. Nous avons également montré qu'une diminution du niveau de transcription des gènes codant pour les ARNr phénocopie la surproduction de (p)ppGpp. Cette diminution a été obtenue par CRISPR interférence en ciblant trois des sept opérons codant pour les ARNr de *E. coli*. La déstabilisation du complexe ouvert d'initiation de la transcription des ARNr par le (p)ppGpp et la diminution du nombre de ribosomes qui en découle sont donc suffisantes pour rendre compte du rôle essentiel de l'alarmone dans la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB. Une diminution de la vitesse de croissance est l'un des principaux effets de la diminution du niveau de transcription des ARNr en réponse à une augmentation de la concentration de (p)ppGpp (Levin et al. 2017). Nous avons montré qu'une diminution de la vitesse de croissance n'est pas une condition suffisante pour activer le mécanisme de résistance aux β -lactamines médiée par YcbB. En effet, nous avons identifié des mutations dans le gène *rpoB* qui augmentent le temps de génération sans permettre la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB. En revanche, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que l'augmentation

du temps de génération soit une condition parmi d'autres pour l'expression de la résistance car toutes les mutations du gène *rpoB* qui phénotypaient la surproduction de (p)ppGpp ont entraîné des augmentations du temps de génération par rapport à la souche parentale (de 4 min pour la plus faible d'entre elles).

Les travaux d'autres laboratoires attribuent l'effet létal du cycle futile déclenché par la fixation des β -lactamines à leurs cibles à une augmentation de la demande énergétique entraînant *in fine* la production de ROS (Kawai et al. 2019; Lobritz et al. 2022). La synthèse des ribosomes consomme environ 40% de l'ATP indiquant qu'une diminution de la synthèse des ARNr pourrait contribuer à significativement limiter la demande énergétique déclenchée par la fixation des β -lactamines à leurs cibles (Maguire 2009). Nos observations sont en faveur du rôle (p)ppGpp dans une atténuation des effets du cycle futile. L'équipe de Thomas G. Bernhardt a montré qu'une surproduction de l'endopeptidase MepS remplace partiellement la production de (p)ppGpp pour la résistance au mecillinam (Lai et al. 2017). Cette surproduction diminue le cycle futile en permettant une synthèse accrue du peptidoglycane médiée par les PBP de classe A. Nous avons montré qu'une surproduction de l'endopeptidase MepS compense également l'absence de l'alarmone pour l'expression de la résistance aux β -lactamines médiée par YcbB. Dans ce contexte, la PBP1b qui forme un complexe avec YcbB *in vitro* et qui est essentielle pour la résistance aux β -lactamines pourrait avoir une contribution majeure dans la polymérisation du peptidoglycane et diminuer le cycle futile (Caveney et al. 2019; Hugonnet et al. 2016).

La diminution du nombre de ribosomes par cellule pourrait également agir en aval en limitant les effets du stress oxydant déclenché par le cycle futile. Ainsi, une diminution de la densité des ribosomes dans les polysomes favorise le recul de la RNAP permettant (i) d'améliorer la réparation de l'ADN lorsque la RNAP est bloquée par la présence d'un nucléotide modifié dans la matrice ADN et (ii) d'améliorer la correction des erreurs de transcription (activité « proof-reading » de la RNAP) (Bar-Nahum et al. 2005; Epshtein et al. 2014; Kamarthapu et al. 2016; Kireeva et al. 2008; Nudler 2012). Une diminution du nombre de ribosomes par cellule pourrait également diminuer la concentration intracellulaire d'ions par effet Gibbs-Donnan limitant ainsi la pression de turgescence exercée par le cytoplasme sur le peptidoglycane (Basan et al. 2015; Movilla Miangolarra et al. 2021; Yang et al. 2020).

Pour conclure, nous proposons que (i) la LDT YcbB neutralise l'action lytique des β -lactamines en assurant la réticulation du peptidoglycane, et que (ii) le (p)ppGpp neutralise l'action non-lytique des β -lactamines en limitant l'emballement métabolique, l'augmentation de la synthèse des protéines et l'accumulation de ROS qui endommagent les macromolécules.



Annexe

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09507-0>

OPEN

Structural insight into YcbB-mediated beta-lactam resistance in *Escherichia coli*

Nathanael A. Caveney¹ , Guillermo Caballero¹, Henri Voedts², Ana Niciforovic¹, Liam J. Worrall¹, Marija Vuckovic¹, Matthieu Fonvielle², Jean-Emmanuel Hugonnet², Michel Arthur²  & Natalie C.J. Strynadka¹

The bacterial cell wall plays a crucial role in viability and is an important drug target. In *Escherichia coli*, the peptidoglycan crosslinking reaction to form the cell wall is primarily carried out by penicillin-binding proteins that catalyse D,D-transpeptidase activity. However, an alternate crosslinking mechanism involving the L,D-transpeptidase YcbB can lead to bypass of D,D-transpeptidation and beta-lactam resistance. Here, we show that the crystallographic structure of YcbB consists of a conserved L,D-transpeptidase catalytic domain decorated with a subdomain on the dynamic substrate capping loop, peptidoglycan-binding and large scaffolding domains. Meropenem acylation of YcbB gives insight into the mode of inhibition by carbapenems, the singular antibiotic class with significant activity against L,D-transpeptidases. We also report the structure of PBP5-meropenem to compare interactions mediating inhibition. Additionally, we probe the interaction network of this pathway and assay beta-lactam resistance in vivo. Our results provide structural insights into the mechanism of action and the inhibition of L,D-transpeptidation, and into YcbB-mediated antibiotic resistance.

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology and the Centre for Blood Research, University of British Columbia, Vancouver V6T 1Z3 BC, Canada.

²Sorbonne Université, Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, INSERM, Centre de Recherche des Cordeliers, CRC, 75006 Paris, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to N.C.J.S. (email: ncjs@mail.ubc.ca)

The bacterial cell wall plays a critical role in the strength and viability of bacteria within their natural environs. underscored by the development of beta-lactam antibiotics such as penicillins and cephalosporins, biosynthesis of the major structural component of the bacterial cell wall, peptidoglycan (PG), has been long recognized as an important drug target. PG is composed of extended polymerized glycan strands of alternating beta-1,4 linked *N*-acetyl-glucosamine-*N*-acetyl-muramic acid which crosslink into a net-like mesh via short peptide segments covalently attached at the C3-OH position of the latter sugar¹. The precursor subunits of PG are synthesised in the cytosol and transferred to an undecaprenyl phosphate lipid carrier². This moiety is then flipped to the periplasmic face of the membrane, where polymerisation into glycan strands, release from lipid carrier and peptide crosslinking to the existing PG sacculus occur in concert^{2,3}.

In *Escherichia coli*, this peptide crosslinking reaction is primarily carried out by class A and B penicillin-binding proteins (PBPs). These proteins have D,D-transpeptidase activity and catalyse the cleavage of a D-Ala⁴-D-Ala⁵ peptide bond of the acyl donor and subsequent crosslinking of the D-Ala⁴ carbonyl to the primary amine of a diaminopimelic acid (DAP) residue on the acceptor. This results in a D-Ala⁴_{donor}-DAP³_{acceptor} crosslink¹. This D,D-transpeptidase activity can be blocked by beta-lactam antibiotics, which act as a substrate mimetic of the donor strand peptide bond. Inhibition of this final and crucial step in PG biosynthesis results in destabilisation of the cell wall and ultimately cell death⁴.

Despite the success of beta-lactam antibiotics in the clinic, it has recently been shown that an alternate crosslinking mechanism can lead to the bypass of PBP mediated D,D-transpeptidation. The L,D-transpeptidase YcbB (alternately named LdtD), with remarkably few additional accessory factors, is able to undertake this recovery of PG crosslinking function, even in the presence of many clinically used beta-lactam antibiotics. The factors required include the upregulation of alarmone (ppGpp) synthesis, the class C monofunctional PBP5, and an associated glycosyltransferase (GTase) activity attributed to the class A bifunctional PBP1b⁵ which harbours both GTase and TPase activities in distinct active sites. As with D,D-crosslinked PG, the bypass pathway initiates with GTase catalyzed polymerisation of PG; the resultant growing product strand is acted upon by PBP5 which catalyses a carboxypeptidase reaction targeting removal of the terminal D-Ala⁵ resulting in a donor glycan-tetrapeptide substrate for YcbB. In the last step of the bypass pathway, YcbB catalyses L,D-transpeptidation using this tetrapeptide-containing donor to form a DAP³_{donor}-DAP³_{acceptor} crosslink⁵. L,D-transpeptidases, including YcbB, are not efficaciously inactivated by beta-lactams⁵. The formation of a thioester-containing L,D-transpeptidase-beta-lactam adduct is slow for penicillins and cephalosporins⁶. The acylation reaction is followed by hydrolysis, thereby preventing full inactivation of the enzyme⁶. The D,D-carboxypeptidase PBP5, is inhibited only at high concentrations of beta-lactams⁷.

Although YcbB is resistant to most beta-lactam antibiotics, it is susceptible to inhibition by carbapenem antibiotics such as meropenem and imipenem⁵. Carbapenem antibiotics are a subset of beta-lactam antibiotics which have previously been shown to inhibit other L,D-transpeptidases⁸. This class of antibiotic is of interest, not only due to its ability to inhibit YcbB, but as well the carboxypeptidase activity of PBP5 and the D,D-transpeptidase activity of PBP1b. Further insight into the inhibition of the enzymes in the D,D-transpeptidase bypass pathway could lead to the development of novel inhibitors to better address the current beta-lactam resistance crisis. Additionally, it was recently shown that copper can inhibit L,D-transpeptidation of bacterial cell walls

and specifically inhibit YcbB⁹. This plays an important role in the inherent antimicrobial activity of copper.

In this work, we report the structure of *E. coli* YcbB acylated with meropenem. YcbB is seen to consist of a conserved L,D-transpeptidase catalytic domain, with the notable additions of a subdomain on the substrate capping loop, a PG binding domain, and a large scaffolding domain potentially important in mediating partner interactions. This complex domain architecture is unique in comparison to that of well characterised Gram positive and *Mycobacterium* L,D-transpeptidases. In addition, we report in parallel, the structure of a PBP5-meropenem acyl enzyme complex in order to completely describe the molecular interactions which facilitate meropenem inhibition of the YcbB and PBP5 partners. Our results provide structural insight into D,D-transpeptidase bypass in *E. coli* and structural insight into the role of L,D-transpeptidation of PG in Gram negative bacteria. Additionally, we probe the protein interaction network and affinities for the D,D-transpeptidase bypass pathway and assay YcbB mediated beta-lactam resistance in an in vivo setting allowing further mechanistic insight into this drug resistance pathway and generated phenotype.

Results and discussion

***E. coli* YcbB X-ray crystallographic structure.** To investigate the role of YcbB in beta-lactam resistance at the atomic level and provide insight into L,D-transpeptidase activity in Gram negative bacteria, the X-ray crystallographic structure of *E. coli* YcbB was pursued. Cocrystals, generated in the presence of 1 mM meropenem at pH 7.5, displayed *P*₄₃₂₁₂ symmetry with unit cell dimensions of *a* = 126.5 Å, *b* = 126.5 Å, *c* = 88.8 Å and a diffraction resolution of 2.76 Å. There is one molecule of YcbB in the asymmetric unit. The structure solution was phased using a distinct SIR dataset of a heavy atom (ethyl mercury phosphate) soaked crystal with final refinement statistics presented in Supplementary Table 1. The resulting maps showed well resolved electron density for the majority of the enzyme chain (Supplementary Fig. 1), allowing near complete tracing of the YcbB model (see Methods). As in solution, the structure indicates a monomeric form of the enzyme with no obvious crystallographic formation of larger oligomers. The overall dimensions of the enzyme are 74 × 73 × 40 Å with a total surface area of ~24,400 Å², and with a largely positive electrostatic distribution across the catalytic domain and largely apolar distribution across the PG and scaffolding domains. An extended electropositive active site demarcated by bound meropenem antibiotic lies across the catalytic domain with appropriate clefts for both donor and acceptor substrates adjacent and continuous (Fig. 1). The observed overall architecture of YcbB (Fig. 1) has several distinct features from all currently deposited L,D-transpeptidase structures, as suggested from the unique insertions and substitutions in sequence alignments with previously characterized Gram positive and mycobacterial species (7.1–14.3% sequence identity; Supplementary Fig. 2). The well ordered central catalytic domain, comprised of residues 375–576, forms a canonical L,D-transpeptidase fold harbouring an extended active site cleft with the expected conserved active site motif¹⁰ (HX_{15–18}[S/T]XGCh[R/N]), where X represents any residue, and *h* is any hydrophobic residue), but with the notable insertion of a unique substrate capping subdomain (residues 422–495), unprecedented in size and observed secondary structural elements and lying adjacent to the meropenem-acylated catalytic site. On the opposite face of the central catalytic domain, an also unprecedented N-terminal region, central helix, and C-terminal helical tail (residues 37–233, 352–374, and 605–615 respectively) are proximal and form a collective helical bundle we term the scaffold domain, and predict to play a potential role in protein–protein interactions in YcbB-

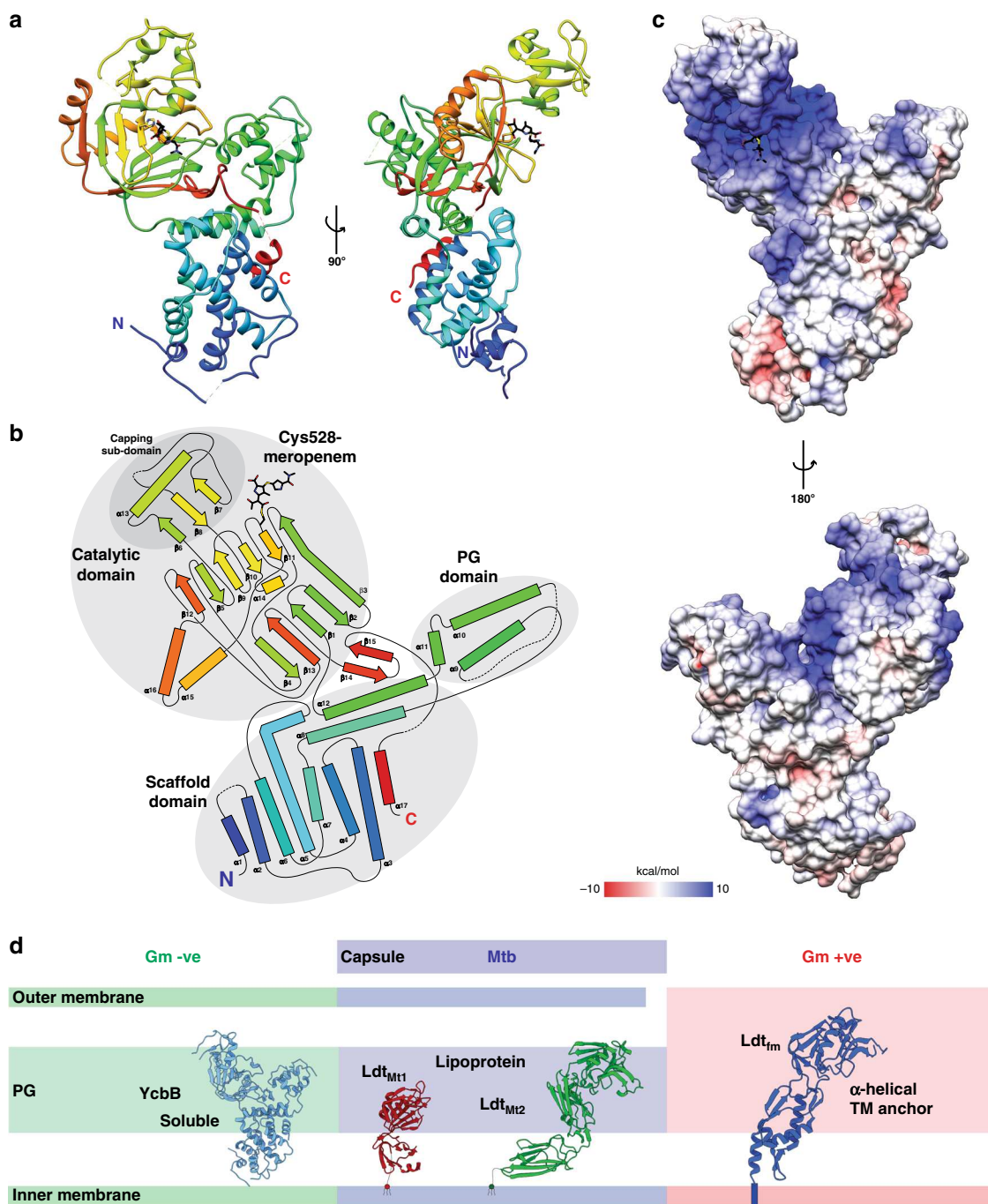


Fig. 1 Overall architecture of *E. coli* YcbB. **a** The crystal structure of YcbB-meropenem acyl-enzyme complex in ribbon representation, coloured in rainbow from N-terminus (blue) to C-terminus (red). Meropenem stick representation is coloured in black and by heteroatom. Two views related by a 90° rotation along the *y*-axis. **b** Topology diagram of YcbB-meropenem acyl-enzyme complex, coloured as in **a**. The catalytic, PG and scaffolding domains are annotated and circled in grey. **c** Electrostatic surface representation of YcbB in two views related by a 180° rotation around the *y*-axis. **d** Diversity of structurally characterised L,D-transpeptidases. Gram negative (green background), soluble YcbB in sky blue; Mycobacterial (blue background), lipoprotein Ldt_{Mt1} (PDBID 5E5L⁸) and Ldt_{Mt2} (PDBID 5DU7⁸) in red and green; Gram positive (red background), TM anchored Ldt_{Tm} (1ZAT¹⁶) in dark blue

mediated resistance⁵. Residues 234–351 form a small antiparallel three helical bundle, with features reminiscent of previously observed PG binding regions—and thus we term here the PG domain¹¹. Residues 577–604 form a beta-hairpin linker between the catalytic domain and the C-terminal recursion.

YcbB scaffold domain structure. The scaffold domain of YcbB is comprised of ten helices packed into a helical bundle. The seven

core α -helices are contributed by residues 100–213, with the eighth α -helix contributed from the C-terminal recursion involving residues 600–615 (Fig. 1). Two additional helices (residues 214–233 and 352–374) cap the domain and structurally link the catalytic and PG binding domains. Residues downstream (31–99) form a generally less ordered region with interspersed α -helical segments which sit distal to the other domains of YcbB. The scaffold domain is unique to the YcbB sub-family of L,D-transpeptidases, suggesting a specific functional and/or regulatory role

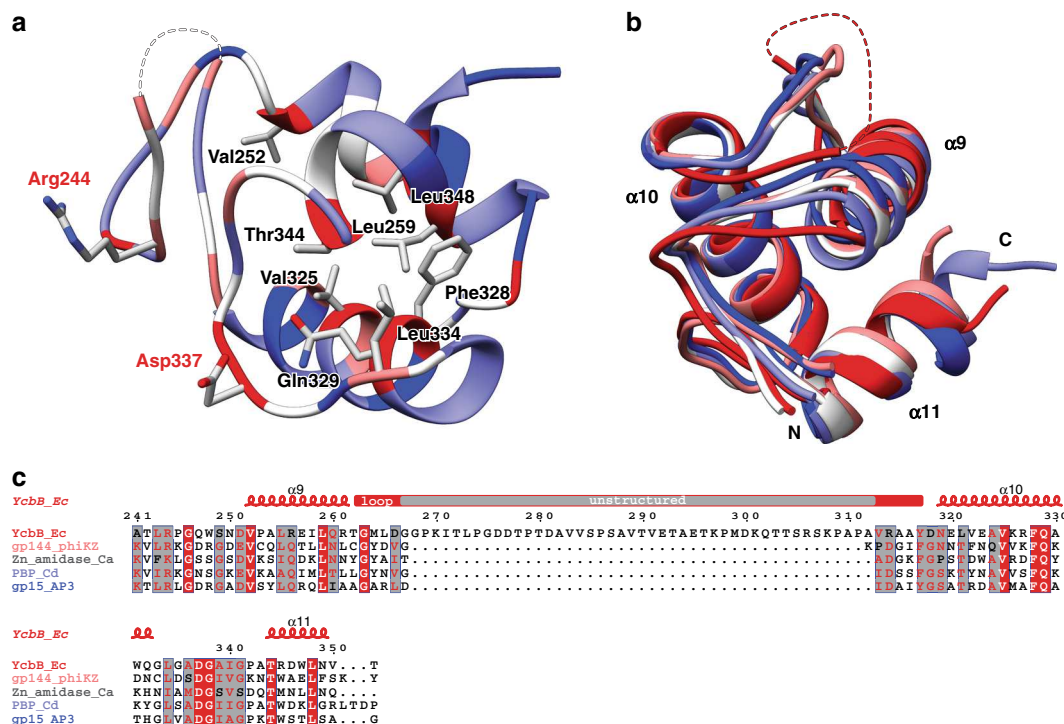


Fig. 2 Structure of the *E. coli* YcbB peptidoglycan binding domain. **a** Ribbon representation of the *E. coli* YcbB peptidoglycan binding domain, residues 241–351, with residue conservation mapped to backbone colour from red to blue in decreasing conservation. Conserved core residues labelled in black and key, surface exposed, peptidoglycan binding residues labelled in red. **b** Overlay of YcbB peptidoglycan binding domain and high scoring peptidoglycan binding domains from a structural homology search on the Dali server¹⁴. YcbB in red, gp144, a *Pseudomonas aeruginosa* phage phiKZ endolysin in salmon (PDB ID 3BKH¹⁵), a *Clostridium acetobutylicum* zinc-dependent amidase in white (PDB ID 4XXT), a *Clostridium difficile* PBP in pale blue (PDB ID 5TV7), and gp15, a *Burkholderia* AP3 phage endolysin in dark blue (PDB ID 5NM7¹¹). Peptidoglycan binding domain structures are coloured from red to blue based on decreasing structural homology. **c** The sequence of *E. coli* YcbB (YcbB_Ec) aligned with peptidoglycan binding domains from phiKZ gp144 (gp144_phiKZ), *C. acetobutylicum* zinc-dependent amidase (Zn_amidase_Ca), *C. difficile* PBP (PBP_Cd), and AP3 gp15 (gp15_AP3). Secondary structure of *E. coli* YcbB is displayed atop the sequence alignment, with the extended loop shown in red and the unstructured region in grey

we predict to involve interaction with the known YcbB unique protein partners PBP5 and PBP1b⁵. These interactions are likely crucial for localization of YcbB to the site of late stage PG synthesis, as, unlike L,D-transpeptidases from Gram positive bacteria or *Mycobacterium*, YcbB does not have a α -helical transmembrane tether or N-terminal lipidation (Fig. 1d). Rather, YcbB is predicted to be targeted to the periplasmic space using a characteristic sec-dependent signalling sequence (residues 1–30—SignalP 4.1¹²), which is subsequently processed through proteolytic cleavage with release of soluble YcbB.

YcbB peptidoglycan binding domain. Many characterized L,D-transpeptidases have been shown to contain PG binding motifs/domains, often a LysM domain consisting of a $\beta\alpha\alpha\beta$ fold with the two α -helices located on the same side of an antiparallel beta-sheet¹³. In YcbB, residues 234–351 form a small antiparallel three helical bundle which, based on these prior observations, is suggestive of a putative PG binding domain (Fig. 2) albeit a PG binding domain more characteristic of lytic phage enzymes and a Zn-dependent bacterial amidase than PG binding motifs observed in other structurally characterized L,D-transpeptidases. Structural homology analysis, via the DALI protein structure comparison server¹⁴, finds close structural homologues—gp144, a *Pseudomonas aeruginosa* phage phiKZ endolysin (PDB ID 3BKH¹⁵, Z-score 9.7, RMSD 1.9), a *Clostridium acetobutylicum* zinc-dependent amidase (PDB ID 4XXT, Z-score 9.6, RMSD 1.9), a *Clostridioides difficile* PBP (PDB ID 5TV7, Z-score 9.4, RMSD 2.0), and gp15, a *Burkholderia* AP3 phage endolysin (PDB ID 5NM7¹¹, Z-score 9.4, RMSD 2.0). The three antiparallel helices

are common to all five PG binding domains, though in YcbB the loop region between the first and second helices contains a dynamic and relatively conserved extension (residues 262–318 with the central region therein highly disordered). Due to the lack of this loop extension in the above identified structural homologues, it is possible that these residues become more stabilised upon PG binding, increasing the effective interaction interface or specificity with PG substrates in this family. The PG domain of YcbB contains many conserved residues with other YcbB family members primarily in the hydrophobic core of the motif (Val252, Leu259, Ala324, Val325, Phe328, Gln329, Leu334, and Leu348) as well as in two surface exposed residues, Arg244 and Asp337, which have been implicated previously as essential in PG binding¹¹.

YcbB catalytic domain. The central YcbB catalytic domain adopts a characteristic L,D-transpeptidase fold (Fig. 3) constructed of two (five and six stranded) curved, mixed beta-sheets disposed in a clam-shell like manner with α -helices 15 and 16 situated in the cleft between. Acting as a hinge, beta-strand 3 participates in both beta-sheets of the domain. Situated just downstream of beta-strand 11, the active site is demarcated by the meropenem acylated catalytic cysteine nucleophile (Cys528) with the conserved histidine base (His509) protruding from beta-strand 10. The oxyanion hole, presumed to stabilize the developing tetrahedral oxyanion transition state during acylation and deacylation is comprised of the main chain nitrogen atoms of Cys528 and Tyr507.

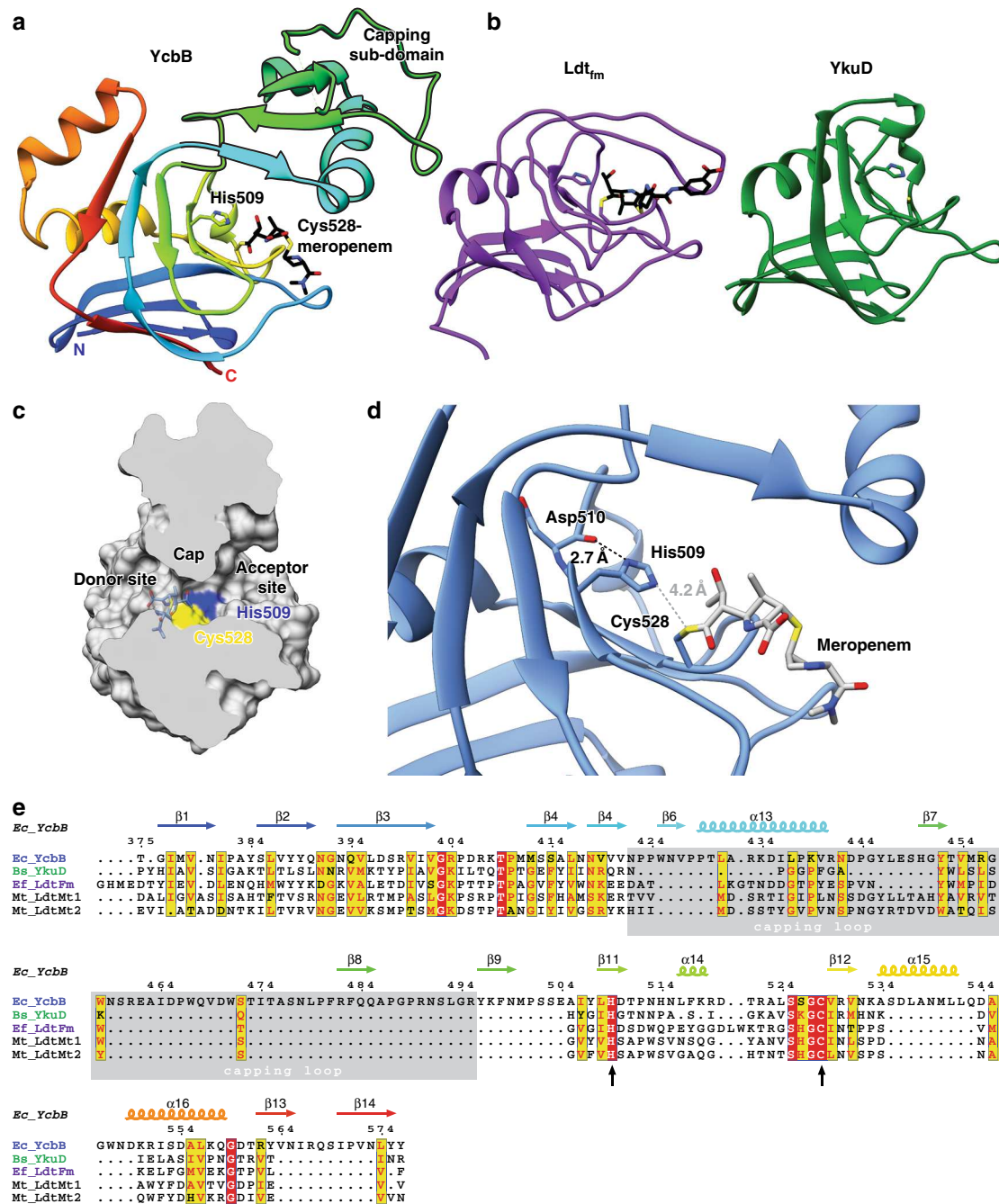


Fig. 3 Structure of the *E. coli* YcbB catalytic domain. **a** A ribbon representation of the YcbB catalytic domain, residues 375–576, coloured in rainbow from red (N-terminus) to blue (C-terminus). Meropenem is represented in black and coloured by heteroatom. The unique capping sub-domain is highlighted in a bold silhouette. **b** The catalytic domain architecture of *Enterococcus faecium* Ldt_{fm} (PDB ID 3ZGP¹⁷) and *Bacillus subtilis* YkuD (PDB ID 1Y7M¹³) highlighting the differences seen among L,D-transpeptidase catalytic domains in the capping loop region. **c** Cut surface representation of the YcbB catalytic domain, showing the capped cleft formed between the donor and acceptor sites by the capping loop sub-domain. The catalytic Cys528 and His509 are coloured in yellow and blue respectively. Meropenem (blue) is overlaid in its position in the donor site, acylating the catalytic cysteine. **d** The active site architecture of *E. coli* YcbB. The catalytic Cys528 is acylated by meropenem and the sulphide is rotated away from the N^ε of His509 (4.2 Å) which activated the cysteine prior to acylation. The N^ε of His509 is seen to be in close proximity with the backbone carbonyl of the adjacent Asp510 (2.7 Å), stabilising and promoting formation of the histidine cation. **e** The sequence of *E. coli* YcbB (Ec_YcbB) aligned with the aforementioned catalytic domains from *E. faecium* and *B. subtilis* (Ef_LdtFm and Bs_Yku, respectively) as well as Ldt_{Mt1} and Ldt_{Mt2} from *Mycobacterium tuberculosis* (Mt_LdtMt1 and Mt_LdtMt2, respectively)

One notable feature of the catalytic domain of YcbB is the large substrate capping sub-domain (residues inserted between beta-strands 5 and 9). This region has been seen to be variant in currently solved structures of L,D-transpeptidases, ranging from small turns (YkuD¹³) to larger loops of up to 19 residues which extend over the active site (Ldt_{fm}^{16,17}) (Fig. 3b). However, YcbB is

the first structure characterized which contains significant secondary structural elements and consequent folded sub-domain in this region (residues 423–487). In YcbB this putative substrate capping sub-domain is comprised of a small three stranded beta-sheet (β6,8,7) and α-helix 13, which sits perpendicular to the beta-sheet at one end. Between beta-strand 7 and 8

there is a large loop region from residue 453 to 481. Beta-strand 6 and α -helix 13 are seen to hinge towards the active site in the meropenem acyl-enzyme complex structure. It has been proposed previously that the substrate capping loop in earlier structures serves to provide inherent flexibility during roles in substrate entrance, capping, and release¹⁸. Despite the more structured and significant nature of the YcbB sub-domain, the density, although traceable, was less well resolved and displayed generally higher temperature factors, all in keeping with an analogous inherent flexible nature and potential similar role(s) in catalysis. Further, crystallographic structures and molecular dynamics simulations of Ldt_{M12} from *Mycobacterium tuberculosis* have recently shown that the substrate capping loop can have variable flexibility dependent on the presence of differing inhibitors with obvious implications for drug discovery efforts against this family^{18,19}. To probe further the potential analogy with the more structured sub-domain in YcbB, we performed 10 ns molecular dynamics simulations (Supplementary Fig. 3) using a CHARMM36 force field (see Methods) which additionally supported the propensity for its highly mobile nature. Interestingly, simulations with meropenem showed increased RMSD spread in the capping loop region but an overall stabilisation of the remainder of the catalytic domain, while in apoenzyme simulations there was increased motion not only in the capping sub-domain but as well over the entirety of the catalytic domain. It is likely that in the action of YcbB on extended native PG substrates, this motion would provide for additional interactions to facilitate binding and product release. In the YcbB-meropenem acyl-enzyme complex structure, the capping subdomain is seen to be stabilised in a position adjacent to the active site, creating a distinct cap over the two substrate binding clefts (Fig. 3c). Meropenem occupies, as expected of a beta-lactam antibiotic, the donor site, further demarcating the adjacent and unoccupied acceptor site. The corresponding volume under the cap in the closed conformation observed is $\sim 810 \text{ \AA}^3$, as calculated by the 3V server²⁰ (Supplementary Fig. 4).

YcbB L,D-transpeptidase mechanism. From the structure of meropenem acylated YcbB, we propose a catalytic mechanism of the L,D-transpeptidase activity of YcbB, which despite the architectural differences is in keeping to what has been proposed for other L,D-transpeptidases previously²¹ (Supplementary Fig. 5). In the proposed mechanism, the conserved Cys528 carries out a nucleophilic attack on the penultimate residue, *meso*-DAP, of a tetrapeptide on the donor PG strand, resulting in the release of the terminal D-Ala. This acyl-enzyme intermediate is subsequently deacylated via nucleophilic attack of a side chain amino on the *meso*-DAP on an adjacent acceptor PG strand. Conserved His509 of the catalytic dyad is seen to be located in close proximity to the catalytic Cys528 (distance N τ to acylated Cys S of 4.2 \AA); we suggest the hydrogen bond distance and angle between base and nucleophile are presumably optimized only in the apo form of the enzyme due to steric restraints induced by the covalently bound substrate in the subsequent acyl intermediate as captured here. Indeed several structures of acylated and apo forms of PBPs support this with high resolution structures showing the hydroxyl group of the catalytic serine nucleophile swings away from the conjugate base upon acylation²². As well, we observe this in our apo molecular dynamics simulations, where the cysteine swings toward His509 within 10 ns of simulation to a final distance of 3.1 \AA between the His N τ to apo Cys S. The backbone carbonyl of the adjacent Asp510 is seen to be located near the N π of His509 (2.7 \AA), forming a stabilising hydrogen bond and potentially modulating the pK_a of the His509 to improve its role as a general base. His509 is seen to be

positioned both proximal to not only the catalytic cysteine, but as well the acceptor site of the catalytic cleft (Fig. 3c, d). This supports the notion that His509, stabilised by Asp510, acts as the general base for the activation of both the acylation and deacylation steps of the L,D-transpeptidase reaction. It has been proposed previously for other L,D-transpeptidases that the catalytic histidine may act as both the general base, as well as to protonate the leaving groups²¹, but from our YcbB-meropenem complex structure we propose that Tyr507 is a more likely candidate for this protonation in the case of YcbB. Tyr507 is more appropriately positioned (Supplementary Fig. 1C), in angle and at 4.2 \AA from the leaving group nitrogen, than the catalytic histidine, which is positioned 7.2 \AA away and appears unlikely to donate this proton. As well, the nearby electropositive Lys497 (4.5 \AA away) and potential hydrogen bond partner Trp425 (3.6 \AA away) could serve to reduce the pK_a of the Tyr507 and allow for its role in protonation of the leaving group. The role of the Tyr507 at this position would be analogous to the role of the SXN motif serine (Ser139 in PBP5) in PBPs²³, a role which has been very well characterized. We note that while a tyrosine residue exists at this position in L,D-transpeptidases from a variety of other species, it is not completely conserved at this position in the L,D-transpeptidase motif. The specific nature of these protonation events can perhaps be unravelled in future Michaelis complex structures of L,D-transpeptidases.

Inhibition of the L,D-transpeptidase mediated resistance pathway. In order to further probe the inhibition of the YcbB-mediated beta-lactam resistance pathway, meropenem acylation of both the L,D-transpeptidase and D,D-carboxypeptidase activities required was investigated (Fig. 4). The YcbB-meropenem complex map had ordered density defining the active site residues including the thiol ester covalent link of Cys528 and acylated meropenem (Fig. 4b). A 2.2 \AA resolution structure of PBP5 acylated with meropenem was also solved with very well ordered density for the covalently bound meropenem (Fig. 4c). Relative to previously published PBP5 structures, we were able to trace additional residues at the C-terminus of PBP5 (387–397; likely afforded by the differential packing with a neighbouring molecule in our unique crystal lattice). Regardless, the conserved binding mode of the ligands between the PBP5-meropenem structure and the PBP5-imipenem structure (PDB ID 3MZF²⁴) indicates similar modes of enzyme acylation and binding. On the other hand, despite the similarity in the PG substrates for the YcbB L,D-transpeptidase and PBP5 D,D-carboxypeptidase, we observe the binding and stabilisation of meropenem between the two enzymes is quite distinct.

Meropenem binds PBP5 in a typical PBP fashion using the conserved SXXK, SXN, and KTG active site sequence motifs common to this broad class of activated serine carboxypeptidases. The meropenem is acylated at C7 by the Ser73 side chain hydroxyl of the SXXK motif (the proximal Lys76 of the motif playing the general base role) and stabilised through an extensive hydrogen bond and electrostatic network (Fig. 4c, g). The carbonyl oxygen on C7 of meropenem occupies the enzyme oxyanion hole comprised of main chain nitrogens at position 73 and 245, forming strong hydrogen bonds that polarize and stabilize the carbonyl during acylation and formation of oxycarbanion intermediates (Fig. 4d). The side chain hydroxyl of Ser 139 of the SXN motif resides adjacent to the leaving group nitrogen of meropenem, the likely source for protonation of that moiety to promote acylation. The Asn141 side chain amide of the SXN motif hydrogen bonds with the 1-hydroxyethyl group on C6 of meropenem, while the Thr243 side chain hydroxyl of the KTG motif forms bidentate hydrogen bonds to the carboxylic acid

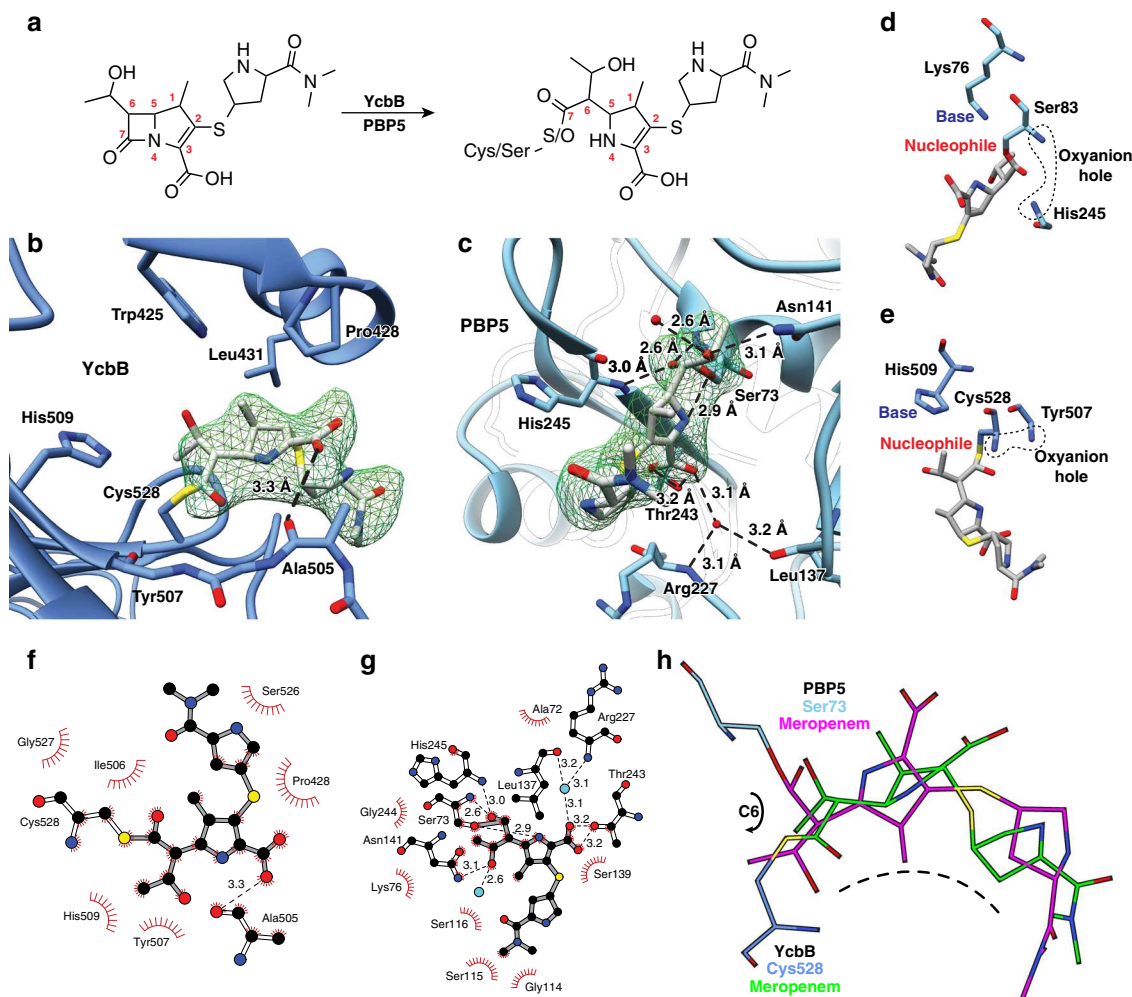


Fig. 4 Meropenem inhibition of *E. coli* YcbB and PBP5. **a** Chemical diagram of meropenem pre- and post-acylation by YcbB and PBP5. **b** mF_o-DF_c simulated annealing omit map for the acylated meropenem on Cys528 of YcbB, contoured at 2σ . YcbB is in blue and meropenem in grey. The catalytic dyad (Cys528 and His509), selected residues, and meropenem are coloured by heteroatom. Hydrogen bonding between meropenem and the backbone carbonyl of Ala505 is represented with dashed lines. **c** mF_o-DF_c simulated annealing omit map for the acylated meropenem on Ser73 of PBP5, contoured at 2σ . PBP5 is in blue and meropenem in grey. PBP5 residues involved in the stabilization of meropenem, relevant water molecules, and meropenem are coloured by heteroatom. Hydrogen bonding between meropenem, selected residues, and water is represented with dashed lines. Relative arrangement of nucleophile, general base and oxyanion hole (backbone atoms shown) for PBP5 (**d**) and YcbB (**e**). **f, g** LigPlot diagrams of meropenem acyl-enzyme complexes. **f** YcbB-meropenem complex with meropenem in grey and protein residues in white, with atoms coloured by heteroatom. **g** PBP5-meropenem complex coloured as in **f**. **h** Overlay of meropenem-acylated catalytic residues of YcbB (darker blue and green) and PBP5 (lighter blue and pink) showing a similar general curvature of both meropenem molecules, with the notable exception of an approximate 180° rotation about meropenem C6 due to the differing active site architectures of YcbB and PBP5

group of meropenem (C3). The latter is further stabilized by longer range electrostatic interactions with the side chain amide of Lys242 of the motif as well as the guanidinium group of Arg277. As well there are typical hydrogen bonds formed, backbone amide of His245 and water-mediated interactions with the backbone amide of Arg227 and the backbone carbonyl of Leu137.

In contrast, meropenem binding of YcbB is void of this extensive network of hydrogen bonds, instead consisting of acylation at C7 by the catalytic Cys528 and a few key hydrogen bonds (Fig. 4b, f). The carbonyl oxygen on C7 of acylated meropenem protrudes into an oxyanion hole consisting of, analogous to the PBPs, the amide nitrogen of the nucleophile, here Cys528. However, the second commonly observed main chain nitrogen amide of the PBPs is not present in YcbB, instead a close interaction to the carbonyl oxygen at Ala 505 with substrate is observed. A further markedly distinct feature in

the meropenem complex is the minimal non-covalent interactions of the C3 carboxylate of meropenem with enzyme. One hydrogen bond to the backbone carbonyl of Ala505 is the primary interaction, replacing the typical electrostatic interactions observed for this ubiquitous functional group of beta-lactam antibiotics. Despite the relative proximity of electropositive groups such as Arg407, Arg433, Lys434, and Lys497, the proline rich insertion centered at Pro428 appears to provide a structural ridge that prevents significant interaction. This ridge perhaps contributes to the molecular basis for generally poor acylation of YcbB by classic beta-lactam antibiotics compared to classical PBPs, where the electrostatic positioning of the substrate carboxylate by conserved electropositive side chains is a critical, reoccurring theme. At the same time hydrophobic interactions between enzyme and substrate appear more prominent, with, for example, Trp425, Pro428 and Leu431 forming an explicit apolar pocket for binding of the C1 methyl of meropenem. The general

lack of complex hydrogen bonding and increased hydrophobic interactions is characteristic of L,D-transpeptidase acyl-enzyme complexes with carbapenem inhibitors and is seen in meropenem acylation of Ldt_{M12} (PDB ID 4QR7¹⁸). Pre-acylation, there could be additional stabilisation of meropenem from residues of both the active site and the capping loop that allow for proper positioning of the drug for acylation by the catalytic cysteine.

Despite the similarities in the activities of PBP5 and YcbB and therefore some of the common attributes to the inhibition of these enzymes by meropenem, there are major differences in the overall stabilization of these drugs post-acylation. It is likely that PBPs were the target of the evolution of this class of antibiotics, originally in *Streptomyces cattleya* and in subsequent drug development²⁵. This is exemplified by structural properties of the inhibition of these enzymes, with the generally more stabilized meropenem of the acylated PBP5 proving a better inhibitor. As we continue to unravel the importance of L,D-transpeptidase mediated beta-lactam resistance, it will become increasingly relevant to revisit this important class of antibiotic and, using structure guided design, improve upon the binding and inhibition of L,D-transpeptidases by carbapenems.

In vivo assay of YcbB mediated beta-lactam resistance. In order to correlate the sequence and structural aspects of *E. coli* YcbB to its role in antibiotic resistance, antibiograms using a beta-lactam disk diffusion assay were performed (Fig. 5). The antibiotics

ampicillin and ceftriaxone were chosen for use in these assays, as they are well characterized, non-carbapenem, beta-lactam antibiotics that provide insight into the general trends in beta-lactam resistance apart from carbapenems. Unsurprisingly, replacements of both the catalytic cysteine and histidine resulted in a complete loss of the beta-lactam resistance (β -lac^R) phenotype seen in the assay with wild type YcbB.

Of greater interest was the contribution of the capping loop to antibiotic resistance. To this end, the assay was performed with a truncated YcbB containing a YkuD-like capping stub (*ycbB* Δ 426–491), as well as with a Trp425 Ala replacement designed to interfere with the significant hydrophobic interactions the indole side chain was observed to mediate with meropenem in our complex structure. Both of these replacements resulted in an beta-lactam sensitivity (β -lac^S) phenotype. This further validates the proposition that the capping loop, despite its inherent flexibility, plays a crucial role in facilitating YcbB mediated L,D-transpeptidation.

Replacements of the catalytic domain and capping sub-domain provide insight into the requirement for functional L,D-transpeptidase activity in antibacterial resistance, yet an understanding of the role of the PG domain in this resistance and the activity of L,D-transpeptidases in general was poorly understood. While many L,D-transpeptidase enzymes have PG domains of one type or another, these domains have yet to be specifically linked to their role in LD-transpeptidation in vivo. Replacements of both the presumed PG binding residues of the YcbB PG domain (Asp337 and Arg244), as well as a truncation to the extended loop (*ycbB* Δ 268–312) unique to the YcbB PG domain (in comparison to homologous PG domains in other enzymes), were tested using the in vivo beta-lactam resistance assay. Interestingly, only the Asp337Ala replacement and Δ 268–312 deletion resulted in beta-lactam sensitivity. The Arg244Ala replacement resulted in a continued beta-lactam resistance phenotype. We propose that this is likely due to a greater contributing role of Asp337 in the binding of PG in comparison to Arg244. Asp337 is positioned more closely to the cleft between the catalytic and PG domains (Fig. 5a), where the acceptor PG strand would likely lie in order to have access to the acceptor site of the catalytic domain. In contrast, Arg244 is positioned further away from the cleft and less likely to be forming as strong an interaction with the acceptor PG strand (Fig. 5a). Regardless of the contribution of Arg244 in PG binding, this is the first evidence of how an accessory PG binding domain can have implications on L,D-transpeptidase function in an in vivo setting. As the extended loop of the PG domain is on the opposite face from residues proposed to be involved in binding the acceptor PG strand, it is possibly mediating additional interactions with the existing PG sacculus that are important in the context of the greater YcbB mediated resistance pathway. Overall, this clearly shows the importance of the accessory PG binding domains in L,D-transpeptidase function in vivo.

Interaction of YcbB with PBP1b and PBP5. YcbB, PBP5 and PBP1b are known to contribute sequentially in the D,D-transpeptidase bypass pathway in *E. coli*⁵. It was of interest, therefore, to determine whether YcbB interacts directly with these PBPs that provide substrate. To do this assessment, YcbB-PBP1b and YcbB-PBP5 interactions were assayed using microscale thermophoresis (MST). Styrene-maleic acid co-polymer solubilised PBP1b was used to mitigate protein aggregation issues in the capillary that were encountered with detergent-solubilised PBP1b. The YcbB-PBP1b interaction was seen to have a K_d of 250 ± 30 nM (Supplementary Fig. 6A). The YcbB-PBP5 interaction was seen to be somewhat weaker, with the MST data

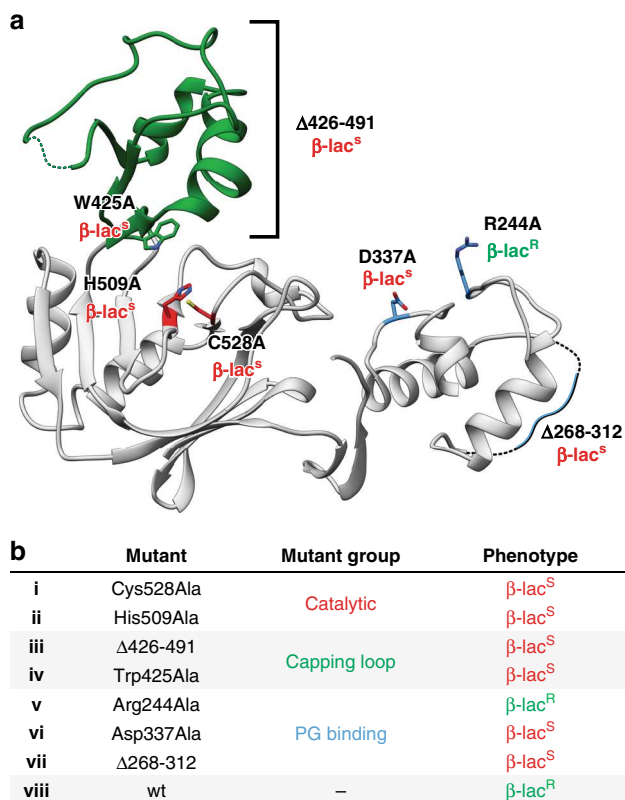


Fig. 5 In vivo assay of YcbB mediated beta-lactam resistance. **a** Various replacements and deletions of the catalytic residues (in red), capping loop region (in green) and PG binding domain (in blue), mapped onto the catalytic and PG domains of YcbB. Replacements retaining YcbB mediated beta-lactam (ampicillin and ceftriaxone) resistance are denoted as β -lac^R, while replacements and deletions resulting in beta-lactam (ampicillin and ceftriaxone) susceptibility are denoted as β -lac^S. **b** Replacements and deletions of pTK2(*ycbB*) (i–viii) are listed with their resulting phenotype

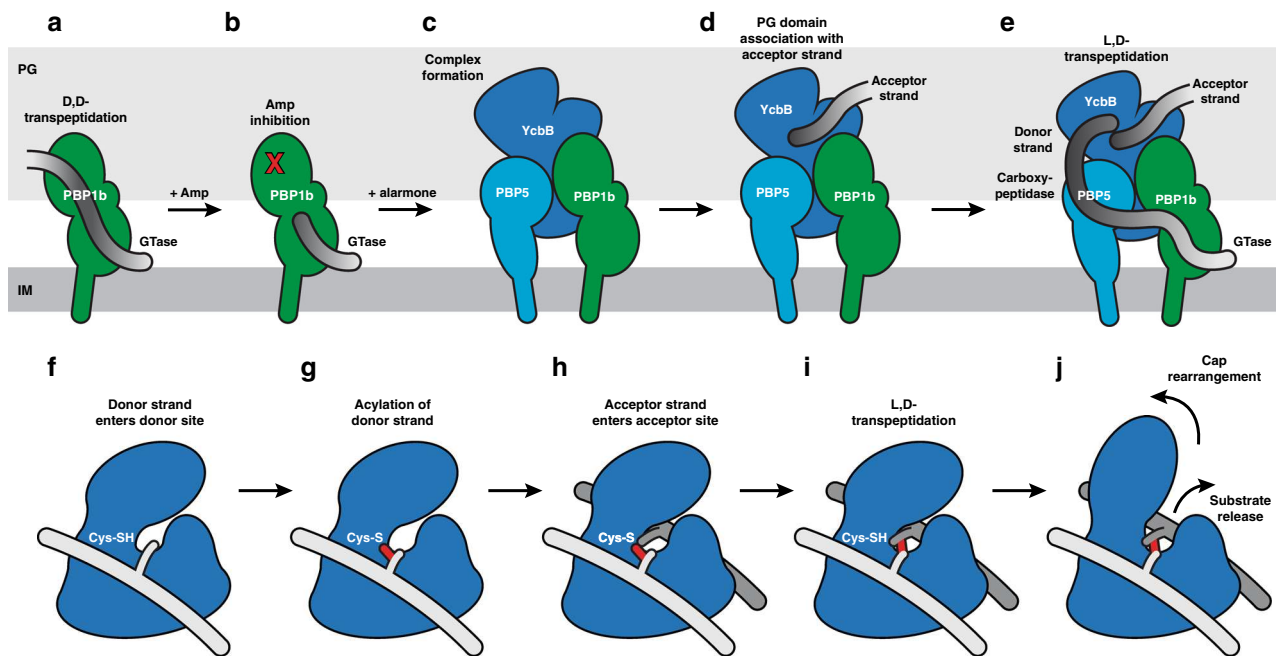


Fig. 6 Schematic representation of YcbB mediated beta-lactam resistance. **a–e** Assembly and function of the YcbB mediated beta-lactam resistance pathway. **a** PBP1b function in the absence of beta-lactam antibiotics. PBP1b acts as both glycosyltransferase and D,D-transpeptidase. **b** PBP1b function in the presence of beta-lactam antibiotics, such as ampicillin. PBP1b can maintain glycosyltransferase activity, but D,D-transpeptidation is inhibited. **c** Beta-lactam resistance complex formation upon production of alarmone. YcbB likely interacts with PBP1b and PBP5 through its putative interaction/helical domain. **d** YcbB is likely additionally associated and oriented through its PG binding domain interacting with the acceptor strand of the existing PG sacculus. **e** The resistance complex can successfully rescue crosslinking function. PBP1b polymerizes PG strands with glycosyltransferase activity, PBP5 removed a terminal D-alanine with its carboxypeptidase activity, and YcbB acts on the modified peptides with L,D-transpeptidase activity to crosslink the PG strand into the sacculus. **f–j** Function and mechanism of the YcbB catalytic domain during L,D-transpeptidation. **f** Tetrapeptide of the donor PG strand enters the donor site of the catalytic domain. **g** Donor tetrapeptide is acylated at its *meso*-DAP residue by the catalytic cysteine, resulting in the loss of the terminal D-alanine. **h** Adjacent acceptor PG peptide enters the acceptor site of the catalytic domain. **i** The covalent acyl-enzyme is deacylated via nucleophilic attack of the side chain *meso*-DAP on the adjacent acceptor PG strand, forming the L,D-crosslink. **j** Rearrangement of the capping loop/sub-domain from a capped conformation to an open cleft will occur, resulting in the release of the crosslinked substrate

suggesting at most a K_d in the low micromolar range ($\sim 2 \mu\text{M}$) (Supplementary Fig. 6B). These affinities are consistent with the generally-accepted understanding regarding the dynamic nature of PG biosynthetic complexes in response to environmental challenges or the particular stage in the life cycle of the bacterium²⁶. Due to the relatively apolar nature of the scaffolding domain of YcbB (Fig. 1) we postulate that these interactions with PBP1b and PBP5 primarily occur through interactions with apolar regions of PBP1b and PBP5. Both PBP1b and PBP5 are seen to exhibit similar electrostatic surface charge characteristics to YcbB, with localized electropositive surface regions about their active sites and more apolarity to their other surface regions (Supplementary Fig. 7). The association of YcbB to the apolar hinge region of PBP5 and the apolar regions of PBP1b's glycosyltransferase domain would localise YcbB to receive the proper substrates from PBP1b and PBP5 to successfully mediate beta-lactam resistance.

Implications on YcbB mediated beta-lactam resistance. The structures reported here further develop our understanding of YcbB mediated beta-lactam resistance and allow us to expand upon the previously proposed model of the resistance pathway⁵ (Fig. 6). Under conditions of increased alarmone production, YcbB and PBP5 are likely able to form a transient complex with PBP1b. The soluble protein YcbB is likely able to couple to the two monotopic membrane proteins, PBP1b and PBP5, to interact directly through its putative interaction/helical domain. As well, YcbB is likely assisted in this localisation and oriented in position

to crosslink a polymerising PG strand by its PG binding domain mediated interaction with the existing sacculus. This is distinct from the role of the LysM-like PG binding domain of YkuD²⁷ and other Ldt enzymes, in which the PG binding domain is oriented adjacent to the donor site of the catalytic domain, as opposed to the acceptor site seen in YcbB (Supplementary Fig. 8). Once the complex has been formed, PBP1b could act to polymerise periplasmically oriented lipid II into a growing PG strand. As beta-lactam drugs inhibit the transpeptidase domain of PBP1b, PBP5 could then assist in rescue of PG formation by removing the terminal D-Alanine, thereby providing the substrate for YcbB. This growing strand would orient itself adjacent to the donor site of YcbB, with the tetrapeptide stem entering into the catalytic cleft. In parallel, the PG domain associated acceptor PG strand would enter the acceptor site of the catalytic cleft. YcbB mediated L,D-transpeptidase activity and substrate release would occur involving rearrangement of the substrate capping loop/sub-domain and resulting in the capped substrate cleft (seen in the acyl-enzyme complex structure) to re-orient into an open cleft. This proposed mechanism for this resistance pathway is consistent with the growing understanding in the field that PG biosynthesis depends on a number of dynamic and variable multi-protein complexes²⁶ that are regulated spatiotemporally and, as in the case of YcbB mediated beta-lactam resistance, by external stimuli. As we enter into an era of increasing antibiotic resistance, unravelling the intricacies of these non-canonical PG biosynthetic complexes will be of increasing importance as bacteria deploy these flexible pathways to evade antibiotic assault.

Methods

Cloning and protein expression. *Escherichia coli* YcbB without its signal peptide (residue 31 onward) was cloned into the expression vector pET41b-GST with a thrombin cleavable, C-terminal 8x His-tag. *E. coli* PBP1b from residue 58 onward was cloned into the expression vector pET41b-GST with a thrombin cleavable, C-terminal 8x His-tag. *E. coli* PBP5 from residue 30 onward was cloned into the expression vector pET41b-GST with a human rhinovirus (HRV) 3C protease cleavable, C-terminal 8x His-tag. Expression constructs were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) for expression of YcbB and PBP5. PBP1b expression construct was transformed into *E. coli* C41. Primers for cloning are listed in Supplementary Table 2. Cells were cultured in ZYP-5052 autoinduction media for 4 h at 37 °C followed by overnight protein expression at 25 °C. Cells were pelleted and stored at –80 °C until required.

Protein purification. For purification of YcbB and PBP5, cell pellets were resuspended in lysis buffer (20 mM Hepes, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% glycerol) and lysed by processing twice with a homogenizer (15 kPa; Avestin). Cellular debris was pelleted by centrifugation at 125,000 × g for 1 h. The resultant supernatant was loaded onto a 1/5 mL Ni²⁺-saturated HisTrap HP Sepharose cartridge (GE Lifesciences), washed with 75 mM imidazole in Buffer A (20 mM Hepes, pH 8.0, 300 mM NaCl), and the protein was eluted with 300 mM imidazole in Buffer A. 1 U of HRV 3C protease or thrombin was added per mg of protein to remove the N-terminal His-tag overnight at 4 °C. Samples were purified further by size exclusion chromatography (SEC) with a Superdex 200 column (GE Lifesciences) equilibrated in Buffer B (20 mM Hepes, pH 8.0, 150 mM NaCl). Fractions containing pure PBP5 or YcbB were pooled and concentrated to 10 to 40 mg/mL. Protein was frozen rapidly in liquid nitrogen and stored at –80 °C until required. For purification of PBP1b, cell pellets were resuspended in lysis buffer (20 mM Hepes, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% glycerol) and lysed by processing twice with a homogenizer (15 kPa; Avestin). Cellular debris was pelleted by centrifugation at 10,000 × g for 30 min. The resultant supernatant was centrifuged at 125,000 × g for 1 h to pellet membranes. The membranes were solubilised in Buffer A with 1% (w/v) N-dodecyl-D-maltopyranoside (DDM) overnight at 4 °C and loaded onto a 1/5 mL Ni²⁺-saturated HisTrap HP Sepharose cartridge (GE Lifesciences), washed with 75 mM imidazole in Buffer A with 0.016% DDM, and the protein was eluted with 300 mM imidazole. One unit of thrombin was added per mg of protein to remove the N-terminal His-tag overnight at 4 °C. Samples were purified further by SEC with a Superdex 200 column (GE Lifesciences) equilibrated in Buffer B with 0.2% DM. Fractions containing pure PBP1b were pooled and concentrated to 10 to 40 mg/mL. Protein was frozen rapidly in liquid nitrogen and stored at –80 °C until required. SMA-solubilised PBP1b was prepared as above, with the extraction occurring in 2% activated SMA and subsequent buffers having no detergent present.

Microscale thermophoresis. MST assays were conducted using a Monolith NT.115Pico (NanoTemper). YcbB, PBP5 and PBP1b were fluorescently labelled using Alexa Fluor 647 NHS Ester (Thermo Fisher Scientific). To evaluate the binding of PBP1b to YcbB, increasing concentrations of unlabelled YcbB (1.5 nM–3.1 μM) were used to titrate fluorescently labelled SMA-solubilised PBP1b at a constant concentration (100 nM). To evaluate the binding of PBP5 to YcbB, increasing concentrations of unlabelled PBP5 (120 pM–98 μM) were used to titrate fluorescently labelled YcbB at a constant concentration (15 nM). Experiments were carried out in a Buffer C. Data was analysed using the NanoTemper MO Affinity Analysis software. The PBP1b–YcbB interaction data was analysed using fluorescence values, while the PBP5–YcbB data was analysed using MST. The data was fit to the equation for a binding isotherm with adjustable Hill coefficient.

X-ray crystallography and structure determination. *E. coli* YcbB protein was crystallized at 20 °C by sitting drop vapour diffusion using 0.2 μL protein solution (30 mg/mL purified protein in Buffer A) and 1 μL of mother liquor (1.44 M lithium sulphate, 0.08 M HEPES pH 7.5, 0.02 M sodium acetate pH 4.6, 0.015 M ammonium sulfate, 4% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 2000 monomethyl ether (MME)) with the addition of 1 mM meropenem. The best diffracting YcbB crystal had the addition of a tetrapeptide (L-Ala-D-Glu-mDAP-D-Ala) at 1 mM, though no density could be found for this ligand. *E. coli* PBP5 protein was crystallized at 20 °C by sitting drop vapour diffusion using 0.2 μL protein solution (5 mg/mL purified protein in Buffer A) and 1 μL of mother liquor (0.1 M tris pH 7, 7% PEG 400) with the addition of 1 mM meropenem. X-ray diffraction data of YcbB–meropenem–ethylmercury and PBP5 was collected on Canadian Light Source beamline 08B1–1 using crystals flash-frozen in liquid nitrogen with the addition of 20% glycerol to the mother liquor. Data for native YcbB–meropenem was collected on Advanced Light Source beamline 501. For phasing of YcbB, a YcbB–meropenem crystal was soaked in mother liquor supplemented with 1 mM ethylmercury phosphate for 30 s. A single isomorphous replacement (SIR) experiment was carried out using the ethylmercury phosphate soaked crystal. All datasets were processed with XDS²⁸, run manually or through Autoproc²⁹. For the SIR dataset, SHARP³⁰ was used for phasing, model building was performed by AutoBuild³¹ and refined using Phenix³² and Coot³³. For the native YcbB dataset and the PBP5 dataset, the structures were solved by molecular replacement using Phaser³⁴. The SIR YcbB

preliminary structure was used as the template for the YcbB structure and PDBID 3MZP was used to phase the PBP5 crystal. These structures were then refined using Phenix³² and Coot³³. The capping loop region of YcbB was refined using density-guided iterative local refinement as implemented in Rosetta³⁵. See Supplementary Table 1 for data collection and refinement statistics. See Supplementary Figs. 1 and 9 for example electron density.

Molecular dynamics simulations. A complete model for the meropenem acyl and apoenzyme forms of YcbB for molecular dynamics simulations was built from our structure of YcbB–meropenem acyl–enzyme complex with missing disordered loop regions built in using ModLoop³⁶. This was then solvated and simulation input files were generated using Quick MD Simulator of the online CHARMM-GUI web service^{37,38}. Equilibration and production simulations were performed with GROMACS 5.1³⁹, using the CHARMM36 all-atom force field⁴⁰ to represent all protein, solvent and ions. Production simulations were run for 10 ns. RMSD calculations were performed using the RMSD Visualizer Tool and HeatMapper of VMD⁴¹.

Impact of substitutions in YcbB on beta-lactam resistance. Beta-lactam resistance mediated by bypass the PBPs requires high-level production of the alarmone (p)ppGpp and of YcbB⁵. In this study, we used strain BW25113Δ*relA*::Km^R pKT8 (*relA*), which allows the arabinose-inducible production of (p)ppGpp. The strain was transformed with the derivatives of pKT2(*ycbB*) for IPTG-inducible expression of YcbB and pf derivatives with amino acid substitutions. Primers used to clone YcbB with amino acid substitutions are listed in Supplementary Table 2. The phenotype was analyzed using the disk diffusion assay in BHI agar supplemented with 50 μM IPTG, 1% arabinose, or both inducers, as previously described⁵. Disks were loaded with 10 μg of mecillinam, 10 μg of ampicillin, 30 μg of ceftriaxone, 30 μg of tetracycline, 30 μg of chloramphenicol, or 30 μg of kanamycin. Incubation was performed at 37 °C overnight. Resistance to beta-lactams [β-lac^R] was defined as growth at the contact of disk containing ampicillin and a diameter <17 mm for the inhibition zone around the disk containing ceftriaxone, as previously described⁵. Susceptibility [β-lac^S] was defined as diameters >20 mm and >35 mm for the inhibition zones around the disks containing ampicillin and ceftriaxone, respectively. We checked that resistance to ampicillin and ceftriaxone was dependent upon the presence of both inducers.

Reporting Summary. Further information on experimental design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

Atomic coordinates for the YcbB–meropenem and PBP5–meropenem models have been deposited in the protein data bank with accession codes 6NTW and 6NTZ respectively.

Received: 24 October 2018 Accepted: 13 March 2019

Published online: 23 April 2019

References

- Sobhanifar, S., King, D. T. & Strynadka, N. C. J. Fortifying the wall: synthesis, regulation and degradation of bacterial peptidoglycan. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 695–703 (2013).
- Lovering, A. L., Safadi, S. S. & Strynadka, N. C. J. Structural Perspective of Peptidoglycan Biosynthesis and Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 451–478 (2012).
- Caveney, N. A., Li, F. K. & Strynadka, N. C. Enzyme structures of the bacterial peptidoglycan and wall teichoic acid biogenesis pathways. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **53**, 45–58 (2018).
- King, D. T., Sobhanifar, S. & Strynadka, N. C. J. One ring to rule them all: current trends in combating bacterial resistance to the β-lactams. *Protein Sci.* **25**, 787–803 (2016).
- Hugonnet, J.-E. et al. Factors essential for L,D-transpeptidase-mediated peptidoglycan cross-linking and β-lactam resistance in *Escherichia coli*. *ELife* **5**, 1–22 (2016).
- Triboulet, S. et al. Kinetic features of L,D-transpeptidase inactivation critical for β-lactam antibacterial activity. *PLoS ONE* **8**, e67831 (2013).
- Curtis, N. A., Orr, D., Ross, G. W. & Boulton, M. G. Affinities of penicillins and cephalosporins for the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12 and their antibacterial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**, 533–539 (1979).
- Kumar, P. et al. Non-classical transpeptidases yield insight into new antibacterials. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 54–61 (2017).
- Peters, K. et al. Copper inhibits peptidoglycan LD-transpeptidases suppressing β-lactam resistance due to bypass of penicillin-binding proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **115**, 10786–10791 (2018).

10. Bianchet, M. A. et al. Structural insight into the inactivation of Mycobacterium tuberculosis non-classical transpeptidase LdtMt2 by biapenem and tepipenem. *BMC Biochem.* **18**, 1–14 (2017).
11. Maciejewska, B. et al. Modular endolysin of Burkholderia AP3 phage has the largest lysozyme-like catalytic subunit discovered to date and no catalytic aspartate residue. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
12. Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* **8**, 785–786 (2011).
13. Bielnicki, J. et al. B. subtilis ykuD protein at 2.0 Å resolution: Insights into the structure and function of a novel, ubiquitous family of bacterial enzymes. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **62**, 144–151 (2006).
14. Holm, L. & Rosenström, P. Dali server: Conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* **38**, 545–549 (2010).
15. Fokine, A., Miroshnikov, K. A., Shneider, M. M., Mesyanzhinov, V. V. & Rossmann, M. G. Structure of the bacteriophage ϕ KZ lytic transglycosylase gp144. *J. Biol. Chem.* **283**, 7242–7250 (2008).
16. Biarrotte-Sorin, S. et al. Crystal Structure of a Novel β -Lactam-insensitive Peptidoglycan Transpeptidase. *J. Mol. Biol.* **359**, 533–538 (2006).
17. Lecoq, L. et al. Structure of Enterococcus faecium I, d-Transpeptidase Acylated by Ertapenem Provides Insight into the Inactivation Mechanism. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1140–1146 (2013).
18. Gokulan, K., Khare, S., Cerniglia, C. E., Foley, S. L. & Varughese, K. I. Structure and inhibitor specificity of L,D-Transpeptidase (LdtMt2) from mycobacterium tuberculosis and antibiotic resistance: calcium binding promotes dimer formation. *Aaps. J.* **20**, 44 (2018).
19. Fakhar, Z. et al. Differential flap dynamics in l,d-transpeptidase2 from Mycobacterium tuberculosis revealed by molecular dynamics. *Mol. Biosyst.* **13**, 1223–1234 (2017).
20. Voss, N. R. & Gerstein, M. 3V: Cavity, channel and cleft volume calculator and extractor. *Nucleic Acids Res.* **38**, 555–562 (2010).
21. Erdemli, S. B. et al. Targeting the cell wall of Mycobacterium tuberculosis: structure and mechanism of L,D-transpeptidase 2. *Structure* **20**, 2103–2115 (2012).
22. King, D. T., Wasney, G. A., Nosella, M., Fong, A. & Strynadka, N. C. J. Structural insights into inhibition of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1B. *J. Biol. Chem.* **292**, 979–993 (2017).
23. Alexander, J. A. N. et al. Structural and kinetic analysis of penicillin-binding protein 4 (PBP4)-mediated antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. *J. Biol. Chem.* **4**, jbc.RA118.004952 (2018).
24. Nicola, G., Tomberg, J., Pratt, R. F., Nicholas, R. A. & Davies, C. Crystal structures of covalent complexes of β -Lactam antibiotics with escherichia coli penicillin-binding protein 5: toward an understanding of antibiotic specificity. *Biochemistry* **49**, 8094–8104 (2010).
25. Birnbaum, J., Kahan, F. M., Kropp, H. & MacDonald, J. S. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am. J. Med.* **78**, 3–21 (1985).
26. Pazos, M., Peters, K. & Vollmer, W. Robust peptidoglycan growth by dynamic and variable multi-protein complexes. *Curr. Opin. Microbiol.* **36**, 55–61 (2017).
27. Schanda, P. et al. Atomic model of a cell-wall cross-linking enzyme in complex with an intact bacterial peptidoglycan. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 17852–17860 (2014).
28. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
29. Fodje, M. et al. 08B1-1: An automated beamline for macromolecular crystallography experiments at the Canadian Light Source. *J. Synchrotron Radiat.* **21**, 633–637 (2014).
30. Bricogne, G., Vornrhein, C., Flensburg, C., Schiltz, M. & Paciorek, W. Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **59**, 2023–2030 (2003).
31. Terwilliger, T. C. et al. Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **64**, 61–69 (2007).
32. Adams, P. D. et al. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).
33. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).
34. McCoy, A. J. et al. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674 (2007).
35. DiMaio, F. et al. Atomic-accuracy models from 4.5-Å cryo-electron microscopy data with density-guided iterative local refinement. *Nat. Methods* **12**, 361–365 (2015).
36. Fiser, A. & Sali, A. ModLoop: automated modeling of loops in protein structures. *Bioinformatics* **19**, 2500–2501 (2003).
37. Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G. & Im, W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* **29**, 1859–1865 (2008).
38. Lee, J. et al. CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field. *J. Chem. Theory Comput.* **12**, 405–413 (2016).
39. Abraham, M. J. et al. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1–2**, 19–25 (2015).
40. Best, R. B. et al. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain $\chi(1)$ and $\chi(2)$ dihedral angles. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 3257–3273 (2012).
41. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 27–28 (1996).

Acknowledgements

We thank Michael Carlson and Franck Duong for the generous sample of activated SMA used for PBP1b solubilisation. We thank Jean-Pierre Simorre and Fred Rossell for advice on L,D-transpeptidases and protein–protein interactions, respectively. Research described in this paper was performed using beamline 08ID-1 at the Canadian Light Source and beamline 501 at the Advanced Light Source. The Canadian Light Source is supported by the Canada Foundation for Innovation, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the University of Saskatchewan, the Government of Saskatchewan, Western Economic Diversification Canada, the National Research Council Canada, and the Canadian Institutes of Health Research. This research also used resources of the Advanced Light Source, which is a DOE Office of Science User Facility under contract no. DE-AC02-05CH11231. This work was funded by operating grants to NCJS from JPIAMR-CIHR and the Howard Hughes International Senior Scholar program. This work was additionally supported by the project NAPCLI from the JPI AMR program to MA (N° ANR-14-JAMR-0003-01). We also acknowledge infrastructure funding from the Canadian Foundation of Innovation and British Columbia Knowledge Development Fund. N.A.C. holds a Centre for Blood Research Graduate Award and NCJS is a Tier I Canada Research Chair in Antibiotic Discovery.

Author contributions

N.A.C. contributed to conceptualization, methodology, investigation, analysis, writing—original draft, review, and editing. G.C. contributed to methodology and investigation. H. V. contributed to investigation and analysis. A.N. contributed to investigation. L.J.W. contributed to investigation and analysis. M.V. contributed to investigation. M.F. contributed to investigation and analysis. J.E.H. contributed to analysis and supervision. M. A. contributed to analysis and supervision. N.C.J.S. contributed to conceptualization, supervision, writing—review and editing, and funding acquisition.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09507-0>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Journal peer review information: *Nature Communications* thanks Anthony Clarke and Seok-Yong Lee for their contribution to the peer review of this work.

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

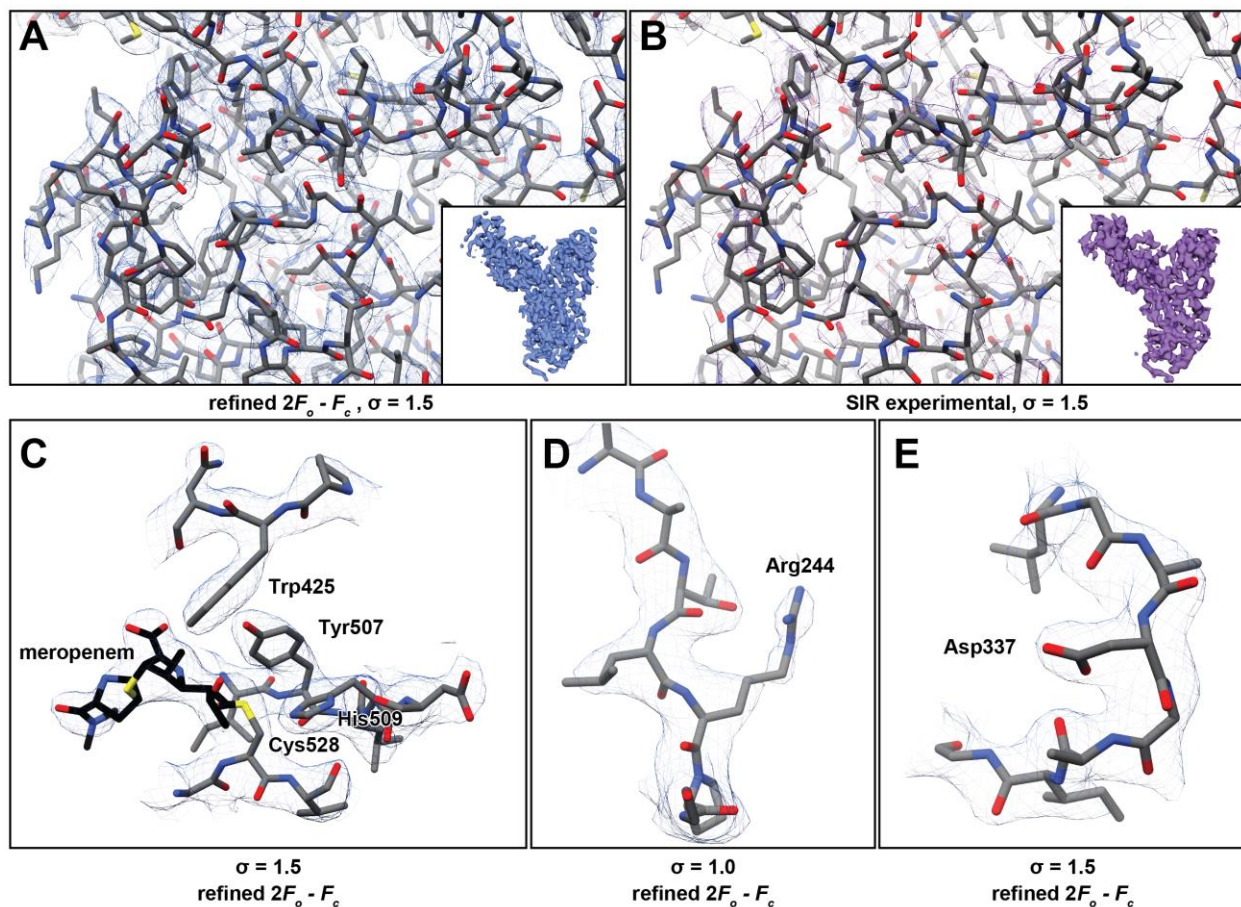


Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative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

© Crown 2019

Supplementary Information - Structural insight into YcbB-mediated beta-lactam resistance in *Escherichia coli*

Nathanael A. Caveney, Guillermo Caballero, Henri Voedts, Ana. Niciforovic, Liam J. Worrall, Marija Vuckovic, Matthieu Fonvielle, Jean-Emmanuel Hugonnet, Michel Arthur, Natalie C. J. Strynadka



Supplementary Figure 1. Electron density maps. (A) Refined $2F_o - F_c$ map, contoured at $\sigma = 1.5$, showing the general map quality after refinement. (B) Initial SIR experimental phasing map, contoured at $\sigma = 1.5$, at the same position as the refined map in A. (C) Refined $2F_o - F_c$ map, contoured at $\sigma = 1.5$, about the active site, showing the density for meropenem, Cys528, His509, Tyr507, and Trp425. (D, E) Refined $2F_o - F_c$ maps, contoured at $\sigma = 1.0$ and 1.5 , about Arg244 and Asp337, respectively.

```

1          10          20          30
Ec_YcbB  MLLNMMC.....GRRLS.AISTCAVTFAPLFNA..QADEPE.....V.....P..
Bs_YkuD  MRKLLTY.....QV.KQGDTSNS.....A.....A.....
Ef_LdtFm MTRSSSHR.....KSKSHVALSAGLGLLVLSFYTYRSTYTKH.....FL.....PNT.....E...NGI
Mt_LdtMt1 HRVVVY.....L..SV.VVAITMFAESVSA..TAAAPF.....V.....L.....L.....
Mt_LdtMt2 MPKVGA.....AQAGTRVRRAC..TAA...TAVMIGAVACGSGRGPAPKVIADKGFADLLVPKLTASVTDGAVG...T...
Mt_LdtMt5 MIVRVLFRVSVLIPVNNSSPTQSQGPISRRLA..TALGGLVLA...LAPNVLVAC..AGKV..TKLAEKRPP....PAPRLTFRPADSAADV..

40          50          60          70          80          90          100         110
Ec_YcbB  GDSPYAVSEGGALPQ.AQATAIMAGIQPLPEGAEKARTQIE..SQLPAGYKPVYLNQLQLLYAARDMOPMWEHRD.....
Bs_YkuD  ADFRIST.....AAL..LQA.NPSS.....IKEDGKVVQEVYKSELGYKDDFTSELSPILNEQNGWT.VVMTYVSAAEKQEI...
Ef_LdtFm NVSNLTV EK.ANEKLEKAYSDDKLL.....AIKEDGKVVQEVYKSELGYKDDFTSELSPILNEQNGWT.VVMTYVSAAEKQEI...
Mt_LdtMt1 VDPVSVTA.ADGVLA.AVTMVNDNG.RP.VAGRLSPDGLRWS..TTEQLGYNRRYTLNATALGLGG.AAT.RQLTF.....
Mt_LdtMt2 PIAPSVEV.GDGWFQ.RVALTNSAG.KV.VAGYSRDRTIYT..ITEPLGYDITYTWSGSVAVGHDKAVP.VAGKF.....
Mt_LdtMt5

120         130         140         150         160         170         180         190
Ec_YcbB  ....AVKAFQQQLAEVAIAGFPQFNKWEVLLDPGVNMTDRDVLSDAMMGYLHFIANIPVKGTRWLYSSKPYALSTPPLSVINQ.WQL
Bs_YkuD  ....QAGLT
Ef_LdtFm QNHQKLDLTTVQTL.....TTKLTLD.....LNKDRTPPT
Mt_LdtMt1 .....Q.....ASVSP
Mt_LdtMt2 .....T.....TSSPAHLTMPYVMP
Mt_LdtMt5 .....T.....TVAPVKTINAGFQL

200         210         220         230         240         250         260         270
Ec_YcbB  ALDQQQLPTFFVAGLAPQHPQYAAHMSLLALLSDTKPWPQLTGKATLRPGQWSNDVPALREILQRTGMLDGGPKITLP...DDT.....
Bs_YkuD  T..DATIE.....KAGDSFVIKPEV
Ef_LdtFm A..NGAVV.....GVAH.....
Mt_LdtMt1 G..DGEVV.....GIGE.....
Mt_LdtMt5 A..DGQTV.....GIAA.....

280         290         300         310         320         330         340
Ec_YcbB  .P..TDAVV.S.....SASVTVETAETK...MDKQTTSRSKPAPAVRAAYDNLVEAVKRFQAWQGLGADGAIG
Bs_YkuD  NGMTID.VDAAVKQLKSAVNSGKDTIELTEFKK...KVTST..EDSSKQLASMN.....
Ef_LdtFm .SIR..ISTPHNTTGH.FEWVAS...NVWRVPHRYWPPHTRVSV..GV.....QELTEGF
Mt_LdtMt1 .AIK..ITNPPVEGA.FYWLNN...REWRWRPEHFWKPGTAVDV..AVNTYGVLDGEGMPGEDNVQTHF...
Mt_LdtMt5 .ALT..TTDPPVEGG.WAWLPDEAQQGARVHWRPREYYPAGTTVDV...DAKLYGLPFGDYGAYQADMSLHF...

350         360         370
Ec_YcbB  PATRDW...NVTFAQRAQ.VLALNI...QR...RLLPTEL.....
Bs_YkuD  .ATAN.VKATYSINGETFPQIPSS...DI...SWLTYNDGK...VLDLDEQVRQYVTDLGTK.YNTSTNDTKFKSKTRGEVTVPVGTYSWT
Ef_LdtFm .SIR..ISTPHNTTGH.FEWVAS...NVWRVPHRYWPPHTRVSV..GV.....QELTEGF
Mt_LdtMt1 .AIK..ITNPPVEGA.FYWLNN...REWRWRPEHFWKPGTAVDV..AVNTYGVLDGEGMPGEDNVQTHF...
Mt_LdtMt5 .ALT..TTDPPVEGG.WAWLPDEAQQGARVHWRPREYYPAGTTVDV...DAKLYGLPFGDYGAYQADMSLHF...

380         390         400         410         420
Ec_YcbB  .....STG...MV.N...PAYS...VYQNGNQ...VLSRVIV...PDR...K...P...M...S...S...A...N...V...V...
Bs_YkuD  IQDSETEALKKAILAGQDFRSPVIGGTTADH...YH...AV.S...GAKT...L...L...N...R...V...M...K...Y...P...I...A...V...G...I...L...T...
Ef_LdtFm .....ETGDALGVAS...SAHTFTVSRNNGE...V...L...R...T...M...P...A...S...L...G...P...S...R...P...I...S...F...H...M...S...E...
Mt_LdtMt1 .....TIGDEV...ATADDNTKI...TVRVNNGE...V...K...M...P...T...S...M...G...D...S...T...P...A...N...C...I...Y...I...G...S...S...Y...
Mt_LdtMt5 .....QIGRRQ...VKAES...SSHRT...QVVTDAQ...Y...I...M...D...F...P...C...S...Y...C...E...A...D...L...A...R...N...V...R...N...C...H...V...T...E...R...Y...

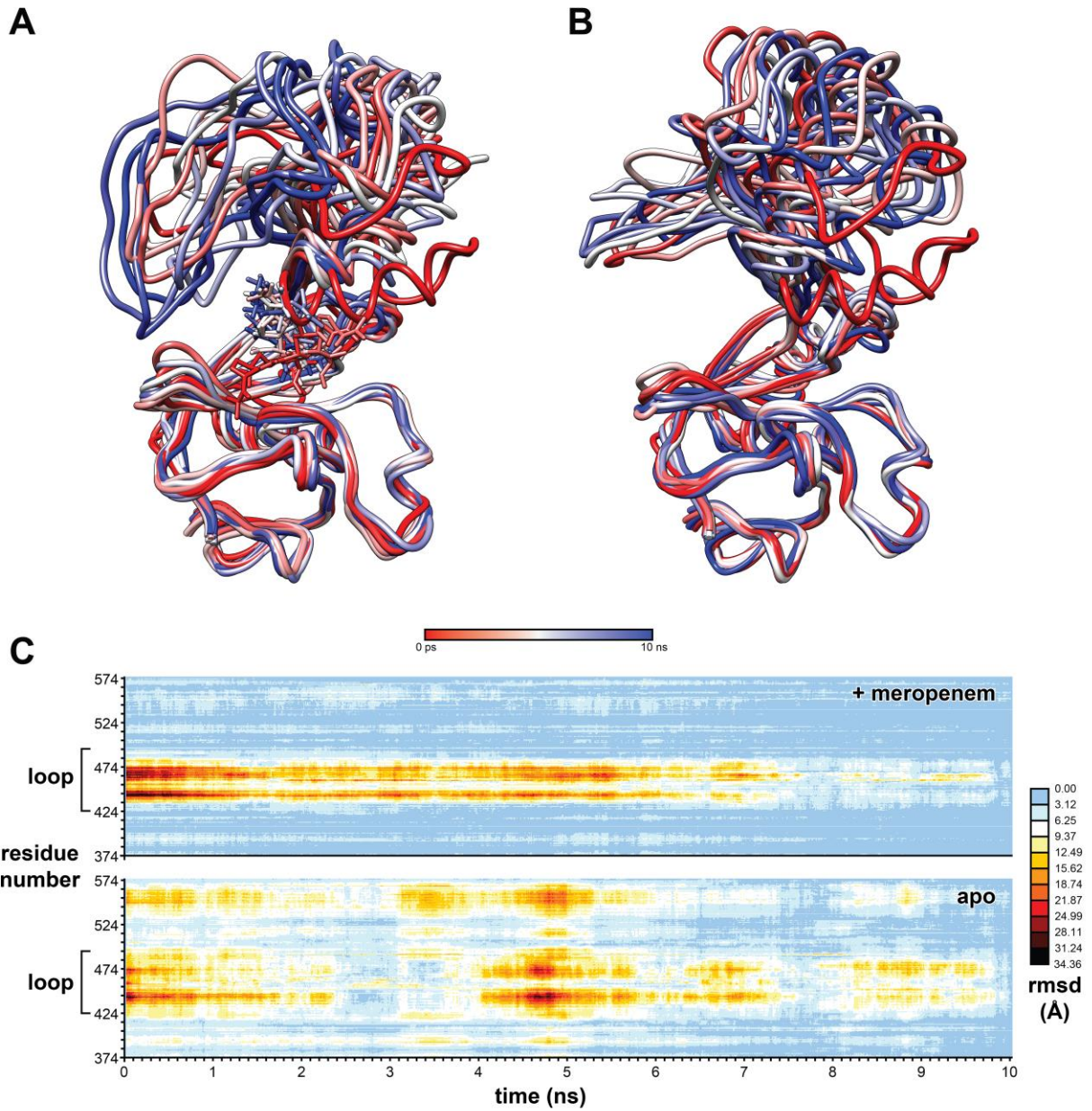
430         440         450         460         470         480         490         500
Ec_YcbB  NPPWNVPTLARKDILPK.V.....RNDPGYL.ESHG...T...MRGWNREAI...DPVQD...WSTITASNLPFRFQQAPGPRNSLGRYKFNMP
Bs_YkuD  .....RNP.....GGPFGA.....Y...W...S...L...S.....K.....
Ef_LdtFm .....EDATLKGTRNDGTPYESPVN.....Y...W...P...I...D.....W.....
Mt_LdtMt1 .....RTVVM.D.SRTIGIPLNSSDGYL.LTAVYARV...T.....W.....
Mt_LdtMt2 .....KHIIMD.SSTYGVPVNSPNGYR.TD...V...M...A...Q...I...S.....Y.....
Mt_LdtMt5 .....SDFYMS...S...T...Y...G...V...P...N...S...P...N...G...Y...R...T...D...V...M...A...Q...I...S.....Y.....N.....

510         520         530         540         550         560         570         580
Ec_YcbB  SEAIY...H...D...T...N...N...N...L...F...K...R...D...T...R...A...L...S...G...C...V...R...V...N...K...A...S...D...L...A...N...M...L...L...Q...D...
Bs_YkuD  ...H...Y...G...H...G...F...N...N...A...S...I...G...K...A...V...K...C...C...R...R...H...N...K...D...V...I...E...L...A...S...I...V...P...N...C...T...R...Y...V...N...R...
Ef_LdtFm ...T...G...V...G...H...D...S...D...W...E...Y...G...D...L...W...K...T...R...S...H...C...M...T...P...S...V...I...K...E...L...F...G...M...V...K...G...P...V...V...F...
Mt_LdtMt1 ...S...G...V...Y...H...S...A...W...S...V...G...A...Q...G...H...T...N...T...S...H...C...I...N...S...P...D...N...A...A...N...Y...F...D...A...V...T...V...C...D...I...E...V...G...
Mt_LdtMt2 ...S...G...V...Y...H...S...A...W...S...V...G...A...Q...G...H...T...N...T...S...H...C...I...N...S...P...D...N...A...A...N...Y...F...D...A...V...T...V...C...D...I...E...V...G...
Mt_LdtMt5 ...N...G...E...F...S...H...A...N...M...S...A...G...A...Q...G...H...T...N...T...S...H...C...I...N...S...P...D...N...A...A...N...Y...F...D...A...V...T...V...C...D...I...E...V...G...

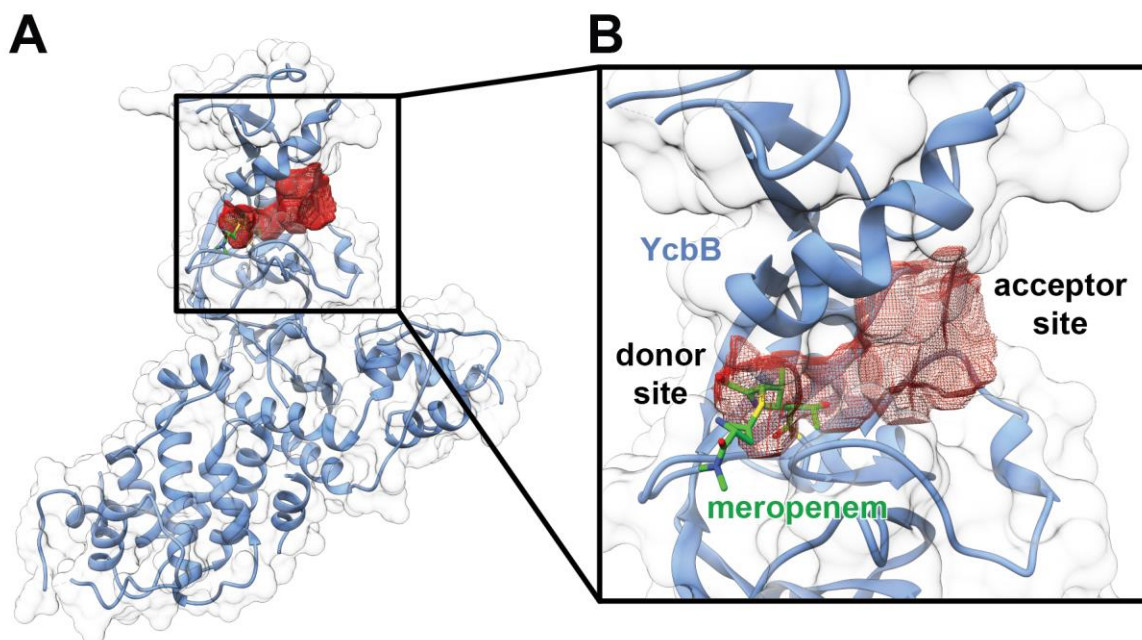
590         600         610
Ec_YcbB  TQYRTDIYNYDLPARSSSQIVSKA.....EQLIR.....
Bs_YkuD  .....
Ef_LdtFm .....
Mt_LdtMt1 .....
Mt_LdtMt2 .....GDWNPWDQWRAGNAKA.....
Mt_LdtMt5 .....WDWAVDWDWTVMSALPFPAAKPAATQIPVTPAVTFPSDAPTFSGTPTTTNGPGG

```

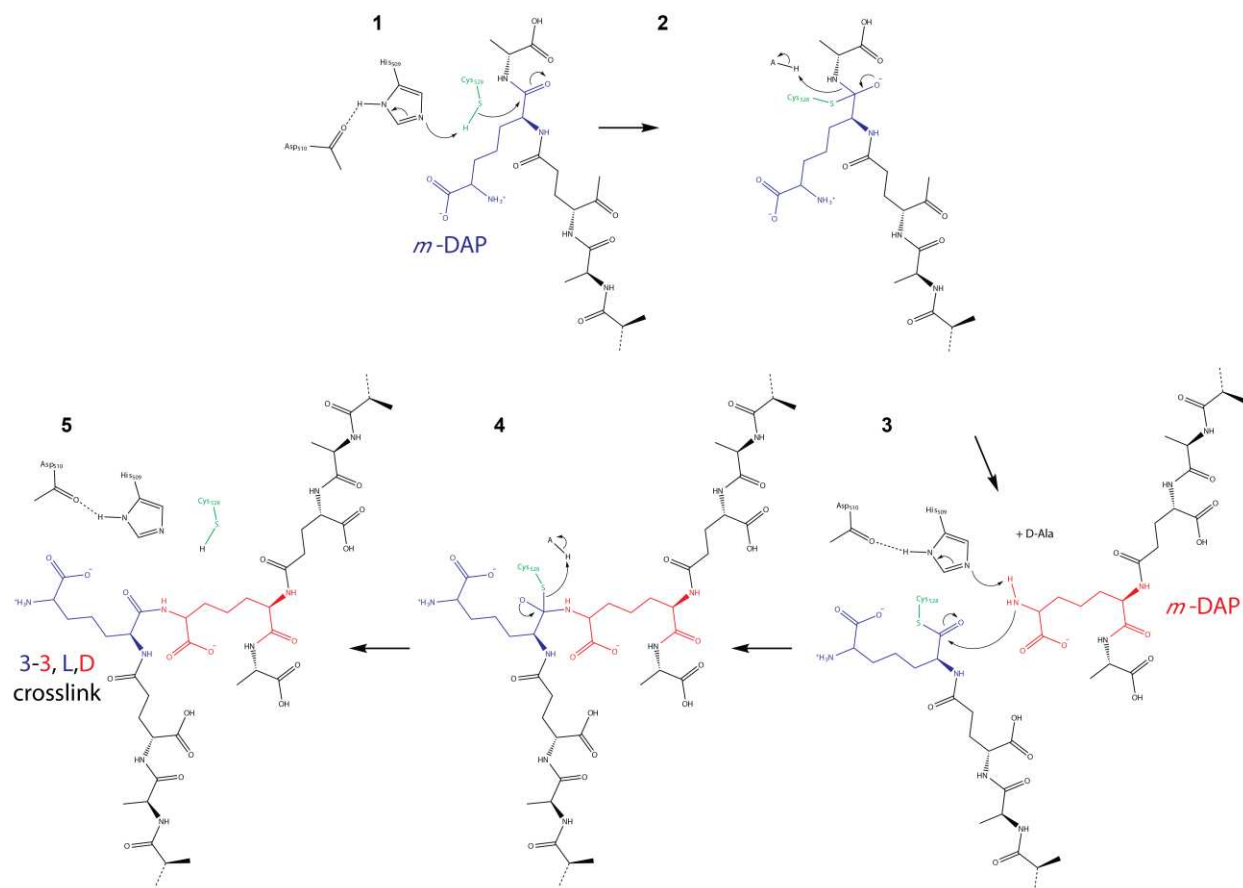
Supplementary Figure 2. L,D-transpeptidase sequence alignments. *E. coli* YcbB aligned with various structurally characterised Gram positive and Mycobacterial L,D-transpeptidases.



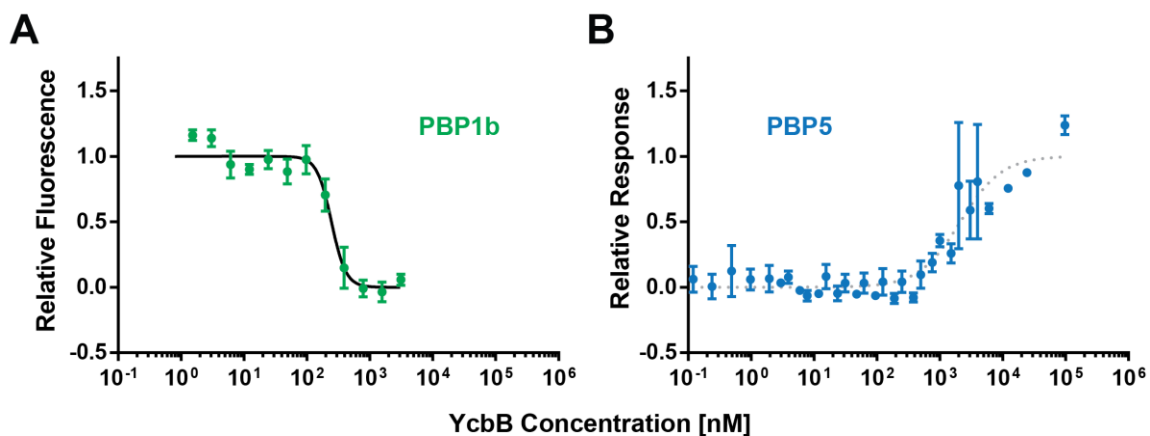
Supplementary Figure 3. Molecular dynamics of *E. coli* YcbB. (A) 10 ns simulation of YcbB and meropenem at 1ns increments, catalytic domain show, coloured from red to blue. (B) 10 ns simulation of YcbB at 1ns increments, catalytic domain show, coloured from red to blue. (C) RMSD of catalytic domain backbone carbons, in angstrom, of YcbB in complex with meropenem (top) and as apoenzyme (bottom).



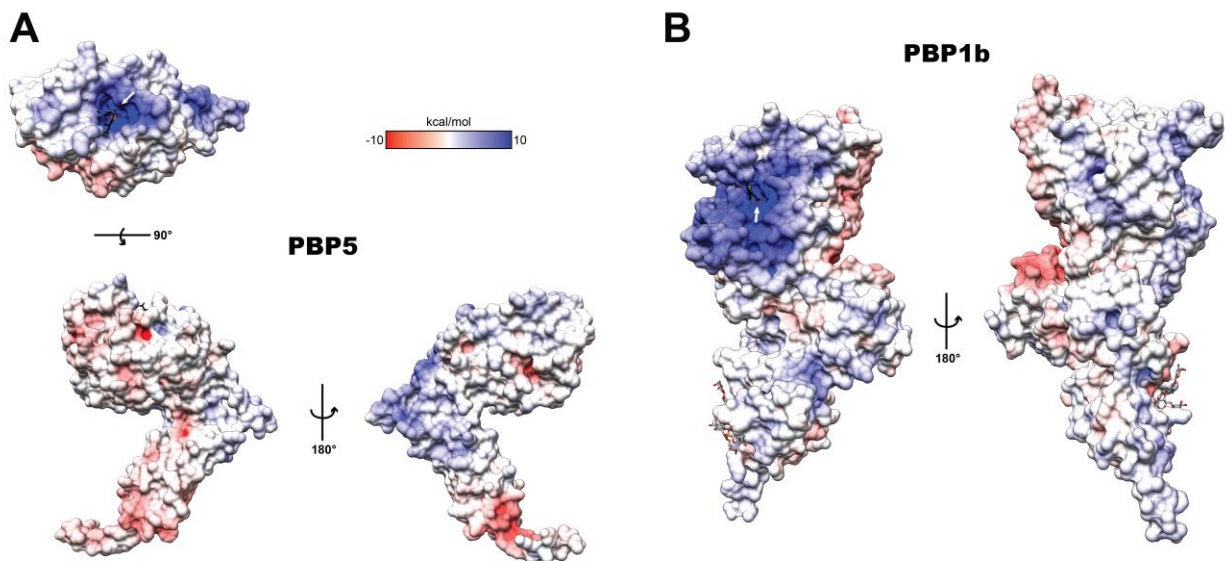
Supplementary Figure 4. Donor and acceptor site volume in YcbB-meropenem acyl-enzyme complex. The 3V calculated volume (811 \AA^3) is depicted in red mesh, YcbB in blue, and meropenem in green. Full length depicted in **A** and a view of the catalytic domain in **B**.



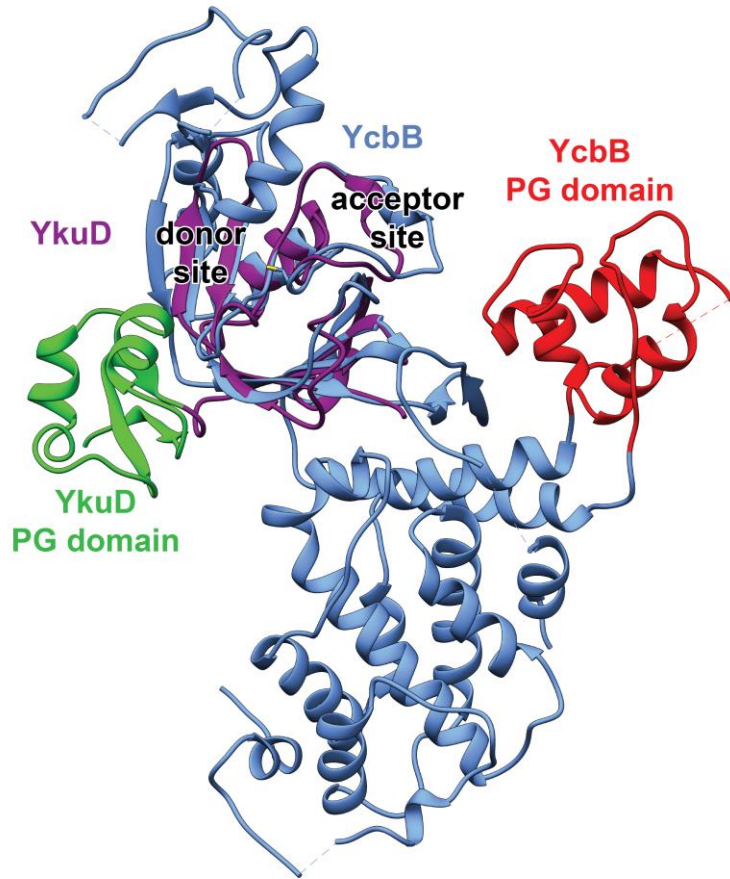
Supplementary Figure 5. Catalytic mechanism of E. coli YcbB L,D-transpeptidase activity. (1,2) Activation of Cys528 by His509 and subsequent cysteine mediated acylation of the penultimate residue, *meso*-DAP, of the tetrapeptide on the growing donor PG strand. This results in the release of the terminal D-Ala residue of the tetrapeptide. (3,4) Deacylation of the covalent acyl-enzyme via nucleophilic attack of a side chain *meso*-DAP on an adjacent acceptor PG strand. (5) The resultant 3-3, L,D crosslink is formed and the enzyme is returned to its starting state.



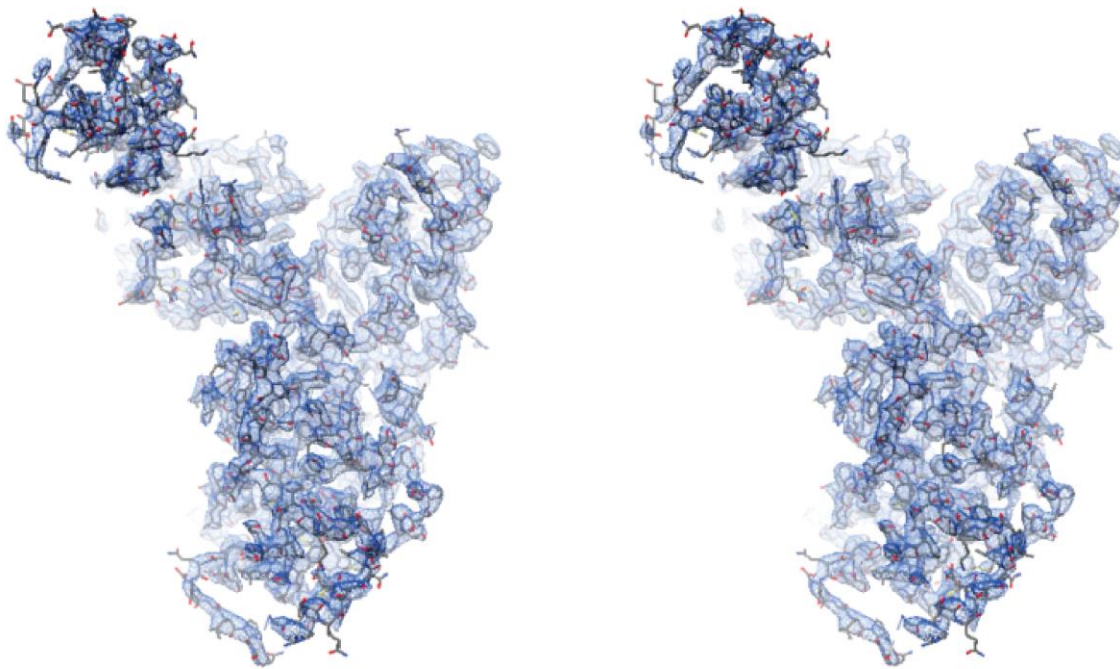
Supplementary Figure 6. *E. coli* YcbB interaction with PBP1b and PBP5. Microscale thermophoresis analysis of PBP1b (**A**) and PBP5 (**B**) interaction with YcbB. (**A**) YcbB-PBP1b interaction was evaluated using relative fluorescence and the data was best fit by a binding isotherm with a K_d of 250 ± 30 nM and a Hill coefficient of 3.8. (**B**) YcbB-PBP5 interaction was evaluated using relative MST response. While it was not possible to work with PBP5 concentrations sufficiently high to observe saturation of all binding sites on YcbB, fitting the data to a binding isotherm yielded K_d and Hill coefficient values of 2.1 ± 0.5 μ M and 1.3, respectively. The affinity between YcbB and PBP5 is the estimated maximum affinity for the complex. Measurements for the YcbB-PBP1b interaction were performed in triplicate with two technical replicates of each. Measurements for the YcbB-PBP5 interaction were performed in triplicate. Error bars represent the standard deviation of the measurements in both cases.



Supplementary Figure 7. Electrostatic surface potential of *E. coli* PBP5 and PBP1b. (**A**) Electrostatic surface representation of PBP5-meropenem acyl-enzyme complex in three views related by a 90° rotation around the x-axis and a 180° rotation around the y-axis. (**B**) Electrostatic surface representation of PBP1b-CENTA acyl-enzyme complex (PDBID 5HLD¹) in two views related by a 180° rotation around the y-axis. Electro positive transpeptidase active sites marked with white arrows in both **A** and **B**.



Supplementary Figure 8. PG binding domain orientation of YcbB and YkuD. Overlay of *B. subtilis* YkuD (magenta, 2MTZ²) and *E. coli* YcbB (blue), highlighting the position of their respective PG binding domains (green and red, respectively). YkuD PG binding domain has been proposed to interact with the donor strand, while YcbB PG binding domain likely interacts with the acceptor strand of the existing sacculus.



Supplementary Figure 9. Stereo electron density map. Refined $2F_o - F_c$ map, contoured at $\sigma = 1.5$, showing the general map quality after refinement.

Supplementary Table 1. Data collection, phasing and refinement statistics

	YcbB Refined	YcbB Native	YcbB Hg	PBP5
Data collection				
Space group	P 4 ₃ 2 ₁ 2	P 4 ₃ 2 ₁ 2	P 4 ₃ 2 ₁ 2	C 2
Cell dimensions				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	126.499, 126.499, 88.8011	126.824, 126.824, 87.903	127.689, 127.689, 87.5560	124.81, 50.8, 80.22
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>g</i> (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 118.688, 90
Resolution (Å)	72.68 - 2.76 (2.859 - 2.76)*	47.92 - 2.19 (up to 3.10 used by SHARP)	47.83 - 2.10	46.08 - 2.2 (2.279 - 2.2)
<i>R</i> _{merge}	0.168 (2.723)	0.075	0.169	0.1767 (1.558)
<i>I</i> / <i>s</i> / <i>I</i>	9.96 (1.05)	9.2	5	4.86 (0.78)
Completeness (%)	99 (100)	71 (96% up to 2.7Å)	89 (100% up to 2.6Å)	100 (99)
Redundancy	12.5 (12.8)	6.4	10.7	3.3 (3.2)
<i>R</i> _{cutis}			0.773	
Refinement				
Resolution (Å)	2.76			2.2
No. reflections	18942 (1826)			22576 (2204)
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	25.61 (42.21) / 29.85 (41.93)			21.03 (39.82) / 25.65 (44.21)
No. atoms				
Protein	4066			2942
Ligand/ion	51			26
Water	21			78
<i>B</i> -factors				
Protein	76.8			53.6
Ligand/ion	85.0			70.7
Water	55.7			53.8
R.m.s deviations				
Bond lengths (Å)	0.016			0.006
Bond angles (°)	1.88			0.99

*Values in parentheses are for highest-resolution shell.

Supplementary Table 2. Primers used in this study

Primer	Sequence
Expression Construct	
31 → <i>ycbB</i> into pET41 - forward	gtttaactttaagaaggagatatacatatggccgatgagcctgaagtaatccctggcgac
31 → <i>ycbB</i> into pET41 - reverse	gtccaggggattactcaggctcatcgcccatatgtatctcctcttaaagttaaac
Residue Replacements	
Cys528Ala – forward	gcattgagctcaggcgtgtacgagtgtaataaagcttcc
Cys528Ala – reverse	ggaagctttattcactcgtacagcgctgagctcaatgc
His509Ala – forward	cagaggccattttggctgacacgccgaaccac
His509Ala – reverse	gtggttcggcgtgtcagccaataaatggcctctg
Δ426-491 – forward	cgtagtgtaaaccccgctggctgctggggcgctataaatc
Δ426-491 – reverse	gaattatagcggccagcgaccagggcggttaccactacg
Trp425Ala – forward	gtagtggttaaaccccgccggaactctactccaactc
Trp425Ala – reverse	gagttggaggtacgttcgcccggggttaccactac
Arg244Ala – forward	ggcaagcaacgttggccccagggcagtgaggtaac
Arg244Ala – reverse	gttactcactgcctgggccaactgttcttgcc
Asp337Ala – forward	caaggattggggcagctggtgctattggcc
Asp337Ala – reverse	ggccaatagcaccagctgcccccaatccttg
Δ268-312 – forward	gcagcggcatgttgacggggttcgcccgcctacgataatg
Δ268-312 – reverse	cattatcgtaggcggcgcgaacccctccaacatgccgctgc

Supplementary References

- King, D. T., Wasney, G. A., Nosella, M., Fong, A. & Strynadka, N. C. J. Structural Insights into Inhibition of Escherichia coli Penicillin-binding Protein 1B. *J. Biol. Chem.* **292**, 979–993 (2017).
- Schanda, P. *et al.* Atomic model of a cell-wall cross-linking enzyme in complex with an intact bacterial peptidoglycan. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 17852–17860 (2014).

Bibliographie

- Åberg, Anna, Victoria Shingler, and Carlos Balsalobre. 2006. "(P)PpGpp Regulates Type 1 Fimbriation of Escherichia Coli by Modulating the Expression of the Site-Specific Recombinase FimB." *Molecular Microbiology* 60(6):1520–33.
- Abraham, E. P., and E. Chain. 1940. "An Enzyme from Bacteria Able to Destroy Penicillin." *Nature* 146:3713 146(3713):837–837.
- Abranches, Jacqueline, Alaina R. Martinez, Jessica K. Kajfasz, Violeta Chavez, Danielle A. Garsin, and José A. Lemos. 2009. "The Molecular Alarmone (p)PpGpp Mediates Stress Responses, Vancomycin Tolerance, and Virulence in Enterococcus Faecalis." *Journal of Bacteriology* 191(7):2248–56.
- Adebali, Ogun, Aziz Sancar, and Christopher P. Selby. 2017. "Mfd Translocase Is Necessary and Sufficient for Transcription-Coupled Repair in Escherichia Coli." *Journal of Biological Chemistry* 292(45):18386–91.
- Alexander, Mary Kate, Anh Miu, Angela Oh, Mike Reichelt, Hoangdung Ho, Cecile Chalouni, Sharada Labadie, Lan Wang, Jun Liang, Nicholas N. Nickerson, Huiyong Hu, Lan Yu, Miaofen Du, Donghong Yan, Summer Park, Janice Kim, Min Xu, Benjamin D. Sellers, Hans E. Purkey, Nicholas J. Skelton, Michael F. T. Koehler, Jian Payandeh, Vishal Verma, Yiming Xu, Christopher M. Koth, and Mireille Nishiyama. 2018. "Disrupting Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Biosynthesis through Inhibition of the Lipopolysaccharide Transporter MsbA." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(11).
- Amanuma, Hiroshi, and Jack L. Strominger. 1980. "Purification and Properties of Penicillin-Binding Proteins 5 and 6 from Escherichia Coli Membranes*." *Journal of Biological Chemistry* 255(23):11173–80.
- Ambler, R. P. 1980. "The Structure of Beta-Lactamases." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 289(1036):321–31.
- Aravind, L., and Eugene V. Koonin. 1998. "The HD Domain Defines a New Superfamily of Metal-Dependent Phosphohydrolases." *Trends in Biochemical Sciences* 23(12):469–72.
- Arbeloa, Ana, Heidi Segal, Jean Emmanuel Hugonnet, Nathalie Josseaume, Lionnel Dubost, Jean Paul Brouard, Laurent Gutmann, Dominique Mengin-Lecreux, and Michel Arthur. 2004. "Role of Class A Penicillin-Binding Proteins in PBP5-Mediated β -Lactam Resistance in Enterococcus Faecalis." *Journal of Bacteriology* 186(5):1221–28.
- Arenz, Stefan, Maha Abdelshahid, Daniel Sohmen, Roshani Payoe, Agata L. Starosta, Otto Berninghausen, Vasili Hauryliuk, Roland Beckmann, and Daniel N. Wilson. 2016. "The Stringent Factor RelA Adopts an Open Conformation on the Ribosome to Stimulate PpGpp Synthesis." *Nucleic Acids Research* 44(13):6471.
- Arthur, Michel, Florence Depardieu, Peter Reynolds, and Patrice Courvalin. 1999. "Moderate-Level Resistance to Glycopeptide LY333328 Mediated by Genes of the VanA and VanB Clusters in Enterococci." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(8):1875–80.

- Asmar, Abir T., Josie L. Ferreira, Eli J. Cohen, Seung Hyun Cho, Morgan Beeby, Kelly T. Hughes, and Jean François Collet. 2017. "Communication across the Bacterial Cell Envelope Depends on the Size of the Periplasm." *PLoS Biology* 15(12).
- Van Asselt, Erik J., Andy Mark W. H. Thunnissen, and Bauke W. Dijkstra. 1999. "High Resolution Crystal Structures of the Escherichia Coli Lytic Transglycosylase Slt70 and Its Complex with a Peptidoglycan Fragment." *Journal of Molecular Biology* 291(4):877–98.
- Atkinson, Gemma C., Tanel Tenson, and Vasili Haurlyiuk. 2011. "The RelA/SpoT Homolog (RSH) Superfamily: Distribution and Functional Evolution of PpGpp Synthetases and Hydrolases across the Tree of Life." *PLoS One* 6(8).
- Atze, Heiner, Yucheng Liang, Jean-Emmanuel Hugonnet, Arnaud Gutierrez, Filippo Rusconi, and Michel Arthur. 2022. "Heavy Isotope Labeling and Mass Spectrometry Reveal Unexpected Remodeling of Bacterial Cell Wall Expansion in Response to Drugs." *ELife* 11.
- Badet, Bernard, Patricia Vermoote, Francois Le Goffic, Pierre Yves Haumont, and Florence Lederer. 1987. "Glucosamine Synthetase from Escherichia Coli: Purification, Properties, and Glutamine-Utilizing Site Location." *Biochemistry* 26(7):1940–48.
- Bahadur, Raj, Pavan Kumar Chodiseti, and Manjula Reddy. 2021. "Cleavage of Braun's Lipoprotein Lpp from the Bacterial Peptidoglycan by a Paralog of L,d-Transpeptidases, LdtF." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118(19).
- Banzhaf, Manuel, Bart van den Berg van Saparoea, Mohammed Terrak, Claudine Fraipont, Alexander Egan, Jules Philippe, André Zapun, Eefjan Breukink, Martine Nguyen-Distèche, Tanneke den Blaauwen, and Waldemar Vollmer. 2012. "Cooperativity of Peptidoglycan Synthases Active in Bacterial Cell Elongation." *Molecular Microbiology* 85(1):179–94.
- Banzhaf, Manuel, Hamish CL Yau, Jolanda Verheul, Adam Lodge, George Kritikos, André Mateus, Baptiste Cordier, Ann Kristin Hov, Frank Stein, Morgane Wartel, Manuel Pazos, Alexandra S. Solovyova, Eefjan Breukink, Sven van Teeffelen, Mikhail M. Savitski, Tanneke den Blaauwen, Athanasios Typas, and Waldemar Vollmer. 2020. "Outer Membrane Lipoprotein Nlpl Scaffolds Peptidoglycan Hydrolases within Multi-enzyme Complexes in Escherichia Coli." *The EMBO Journal* 39(5).
- Baquero, Maria Rosario, Madeleine Bouzon, Jose Carlos Quintela, Juan A. Ayala, and Felipe Moreno. 1996. "DacD, an Escherichia Coli Gene Encoding a Novel Penicillin-Binding Protein (PBP6b) with DD-Carboxypeptidase Activity." *Journal of Bacteriology* 178(24):7106–11.
- Bar-Nahum, Gil, Vitaly Epshtein, Andrei E. Ruckenstein, Ruslan Rafikov, Arkady Mustaev, and Evgeny Nudler. 2005. "A Ratchet Mechanism of Transcription Elongation and Its Control." *Cell* 120(2):183–93.
- Baranowski, Catherine, Michael A. Welsh, Lok-To Sham, Haig A. Eskandarian, Hoong Chuin Lim, Karen J. Kieser, Jeffrey C. Wagner, John D. McKinney, Georg E. Fantner, Thomas R. Ioerger, Suzanne Walker, Thomas G. Bernhardt, Eric J. Rubin, and E. Hesper Rego. 2018. "Maturing Mycobacterium Smegmatis Peptidoglycan Requires Non-Canonical Crosslinks to Maintain Shape." *ELife* 7.
- Barbas, J. A., J. Diaz, A. Rodriguez-Tebar, and D. Vazquez. 1986. "Specific Location of Penicillin-Binding Proteins within the Cell Envelope of Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 165(1):269–75.
- Barker, Melanie M., Tamas Gaal, Cathleen A. Josaitis, and Richard L. Gourse. 2001. "Mechanism of Regulation of Transcription Initiation by PpGpp. I. Effects of PpGpp on Transcription Initiation in

- Vivo and in Vitro." *Journal of Molecular Biology* 305(4):673–88.
- Basan, Markus, Manlu Zhu, Xiongfeng Dai, Mya Warren, Daniel Sévin, Yi-Ping Wang, and Terence Hwa. 2015. "Inflating Bacterial Cells by Increased Protein Synthesis." *Molecular Systems Biology* 11(10):836.
- Bastos, Paulo A. D., Richard Wheeler, and Ivo G. Boneca. 2020. "Uptake, Recognition and Responses to Peptidoglycan in the Mammalian Host." *FEMS Microbiology Reviews* 45(1).
- Battesti, Aurélie, and Emmanuelle Bouveret. 2006. "Acyl Carrier Protein/SpoT Interaction, the Switch Linking SpoT-Dependent Stress Response to Fatty Acid Metabolism." *Molecular Microbiology* 62(4):1048–63.
- Bean, G. J., S. T. Flickinger, W. M. Westler, M. E. McCully, D. Sept, D. B. Weibel, and K. J. Amann. 2009. "A22 Disrupts the Bacterial Actin Cytoskeleton by Directly Binding and Inducing a Low-Affinity State in MreB." *Biochemistry* 48(22):4852.
- Beljantseva, Jelena, Pavel Kudrin, Steffi Jimmy, Marcel Ehn, Radek Pohl, Vallo Varik, Yuzuru Tozawa, Victoria Shingler, Tanel Tenson, Dominik Rejman, and Vasili Haurlyiuk. 2017. "Molecular Mutagenesis of PpGpp: Turning a RelA Activator into an Inhibitor." *Scientific Reports* 2017 7:1 7(1):1–10.
- Bellido, F., C. Veuthey, J. Blaser, A. Banernfeind, and J. C. Pechère. 1990. "Novel Resistance to Imipenem Associated with an Altered PBP-4 in a Pseudomonas Aeruginosa Clinical Isolate." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 25(1):57–68.
- Benson, Timothy E., John L. Marquardt, Anne C. Marquardt, Felicia A. Etzkorn, and Christopher T. Walsh. 1993. "Overexpression, Purification, and Mechanistic Study of UDP-N-Acetylenolpyruvylglucosamine Reductase." *Biochemistry* 32(8):2024–30.
- Di Berardino, Marco, Arnoud Dijkstra, Dietrich Stüber, Wolfgang Keck, and Marcel Gubler. 1996. "The Monofunctional Glycosyltransferase of Escherichia Coli Is a Member of a New Class of Peptidoglycan-Synthesising Enzymes." *FEBS Letters* 392(2):184–88.
- Bernal-Cabas, Margarita, Juan Alfonso Ayala, and Tracy L. Raivio. 2015. "The Cpx Envelope Stress Response Modifies Peptidoglycan Cross-Linking via the L,D-Transpeptidase LdtD and the Novel Protein YgaU." *Journal of Bacteriology* 197(3):603–14.
- Bertsche, Ute, Thomas Kast, Benoît Wolf, Claudine Fraipont, Mirjam E. G. Aarsman, Kai Kannenberg, Moritz Von Rechenberg, Martine Nguyen-Distèche, Tanneke Den Blaauwen, Joachim Volker Höltje, and Waldemar Vollmer. 2006. "Interaction between Two Murein (Peptidoglycan) Synthases, PBP3 and PBP1B, in Escherichia Coli." *Molecular Microbiology* 61(3):675–90.
- Bi, Erfei, and Joe Lutkenhaus. 1991. "FtsZ Ring Structure Associated with Division in Escherichia Coli." *Nature* 1991 354:6349 354(6349):161–64.
- Bianchet, Mario A., Ying H. Pan, Leighanne A. Bramme. Basta, Harry Saavedra, Evan P. Lloyd, Pankaj Kumar, Rohini Mattoo, Craig A. Townsend, and Gyanu Lamichhane. 2017. "Structural Insight into the Inactivation of Mycobacterium Tuberculosis Non-Classical Transpeptidase Ldt Mt2 by Biapenem and Tebipenem." *BMC Biochemistry* 18(1).
- Biarrotte-Sorin, Sabrina, Jean Emmanuel Hugonnet, Vanessa Delfosse, Jean Luc Mainardi, Laurent Gutmann, Michel Arthur, and Claudine Mayer. 2006. "Crystal Structure of a Novel Beta-Lactam-

- Insensitive Peptidoglycan Transpeptidase." *Journal of Molecular Biology* 359(3):533–38.
- Bielnicki, Jakub, Yancho Devedjiev, Urszula Derewenda, Zbigniew Dauter, Andrzej Joachimiak, and Zygmunt S. Derewenda. 2006. "B. Subtilis YkuD Protein at 2.0 Å Resolution: Insights into the Structure and Function of a Novel, Ubiquitous Family of Bacterial Enzymes." *Proteins* 62(1):144–51.
- den Blaauwen, Tanneke, Leendert W. Hamoen, and Petra Anne Levin. 2017. "The Divisome at 25: The Road Ahead." *Current Opinion in Microbiology* 36:85–94.
- Blair, Jessica M. A., Mark A. Webber, Alison J. Baylay, David O. Ogbolu, and Laura J. V. Piddock. 2015. "Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance." *Nature Reviews. Microbiology* 13(1):42–51.
- Blasco, B., A. G. Pisabarro, and M. A. de Pedro. 1988. "Peptidoglycan Biosynthesis in Stationary-Phase Cells of Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 170(11):5224–28.
- Boes, Adrien, Samir Olatunji, Eefjan Breukink, and Mohammed Terrak. 2019. "Regulation of the Peptidoglycan Polymerase Activity of PBP1b by Antagonist Actions of the Core Divisome Proteins FtsBLQ and FtsN." *MBio* 10(1).
- Bohrhunter, Jessica L., Patricia D. A. Rohs, Grasiela Torres, Rachel Yunck, and Thomas G. Bernhardt. 2021. "MltG Activity Antagonizes Cell Wall Synthesis by Both Types of Peptidoglycan Polymerases in Escherichia Coli." *Molecular Microbiology* 115(6):1170–80.
- Bolla, Jani Reddy, Joshua B. Sauer, Di Wu, Shahid Mehmood, Timothy M. Allison, and Carol V. Robinson. 2018. "Direct Observation of the Influence of Cardiolipin and Antibiotics on Lipid II Binding to MurJ." *Nature Chemistry* 10(3):363–71.
- Bonis, Mathilde, Chantal Ecobichon, Stephanie Guadagnini, Marie Christine Prévost, and Ivo G. Boneca. 2010. "A M23B Family Metallopeptidase of Helicobacter Pylori Required for Cell Shape, Pole Formation and Virulence." *Molecular Microbiology* 78(4):809–19.
- Böth, Dominic, Eva Maria Steiner, Daniela Stadler, Ylva Lindqvist, Robert Schnell, and Gunter Schneider. 2013. "Structure of LdtMt2, an L,D-Transpeptidase from Mycobacterium Tuberculosis." *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 69(Pt 3):432–41.
- Boubakri, Hasna, Anne Langlois De Septenville, Enrique Viguera, and Bénédicte Michel. 2010. "The Helicases DinG, Rep and UvrD Cooperate to Promote Replication across Transcription Units in Vivo." *The EMBO Journal* 29(1):145–57.
- Braun, Volkmar, and Klaus Hantke. 2019. "Lipoproteins: Structure, Function, Biosynthesis." *Sub-Cellular Biochemistry* 92:39–77.
- Braun, Volkmar, and Helga Wolff. 1970. "The Murein-Lipoprotein Linkage in the Cell Wall of Escherichia Coli." *European Journal of Biochemistry* 14(2):387–91.
- Brown, Alan, Israel S. Fernández, Yuliya Gordiyenko, and V. Ramakrishnan. 2016. "Ribosome-Dependent Activation of Stringent Control." *Nature* 534(7606):277–80.
- Brown, Pamela J. B., Miguel A. De Pedro, David T. Kysela, Charles Van Der Henst, Jinwoo Kim, Xavier De Bolle, Clay Fuqua, and Yves V. Brun. 2012. "Polar Growth in the Alphaproteobacterial Order Rhizobiales." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(5):1697–1701.
- Brown, T. H., and R. H. Alford. 1984. "Antagonism by Chloramphenicol of Broad-Spectrum Beta-Lactam

- Antibiotics against *Klebsiella Pneumoniae*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 25(4):405–7.
- Buchanan, C. E., and M. O. Sowell. 1982. "Synthesis of Penicillin-Binding Protein 6 by Stationary-Phase *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 151(1):491–94.
- Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. "A Functional Classification Scheme for Beta-Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(6):1211–33.
- Bush, Karen, and Patricia A. Bradford. 2016. "β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors: An Overview." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6(8).
- Cashel, Michael, and Jonathan Gallant. 1969. "Two Compounds Implicated in the Function of the RC Gene of *Escherichia Coli*." *Nature* 1969 221:5183 221(5183):838–41.
- Cava, Felipe, Hubert Lam, Miguel A. De Pedro, and Matthew K. Waldor. 2011. "Emerging Knowledge of Regulatory Roles of D-Amino Acids in Bacteria." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 68(5):817–31.
- Cava, Felipe, Miguel A. De Pedro, Hubert Lam, Brigid M. Davis, and Matthew K. Waldor. 2011. "Distinct Pathways for Modification of the Bacterial Cell Wall by Non-Canonical D-Amino Acids." *The EMBO Journal* 30(16):3442.
- Caveney, Nathanael A., Guillermo Caballero, Henri Voedts, Ana Niciforovic, Liam J. Worrall, Marija Vuckovic, Matthieu Fonvielle, Jean-Emmanuel Hugonnet, Michel Arthur, and Natalie C. J. Strynadka. 2019. "Structural Insight into YcbB-Mediated Beta-Lactam Resistance in *Escherichia Coli*." *Nature Communications* 10(1):1849.
- Caveney, Nathanael A., Franco KK Li, and Natalie CJ Strynadka. 2018. "Enzyme Structures of the Bacterial Peptidoglycan and Wall Teichoic Acid Biogenesis Pathways." *Current Opinion in Structural Biology* 53:45–58.
- Cayley, D. Scott, Harry J. Guttman, and M. Thomas Record. 2000. "Biophysical Characterization of Changes in Amounts and Activity of *Escherichia Coli* Cell and Compartment Water and Turgor Pressure in Response to Osmotic Stress." *Biophysical Journal* 78(4):1748.
- Chang, Shu Jung, Jeongmin Song, and Jorge E. Galán. 2016. "Receptor-Mediated Sorting of Typhoid Toxin during Its Export from *Salmonella Typhi*-Infected Cells." *Cell Host & Microbe* 20(5):682–89.
- Chiaramello, A. E., and J. W. Zyskind. 1990. "Coupling of DNA Replication to Growth Rate in *Escherichia Coli*: A Possible Role for Guanosine Tetraphosphate." *Journal of Bacteriology* 172(4):2013–19.
- Cho, Hongbaek, Tsuyoshi Uehara, and Thomas G. Bernhardt. 2014. "Beta-Lactam Antibiotics Induce a Lethal Malfunctioning of the Bacterial Cell Wall Synthesis Machinery." *Cell* 159(6):1300–1311.
- Cho, Hongbaek, Carl N. Wivagg, Mrinal Kapoor, Zachary Barry, Patricia D. A. Rohs, Hyunsuk Suh, Jarrod A. Marto, Ethan C. Garner, and Thomas G. Bernhardt. 2016. "Bacterial Cell Wall Biogenesis Is Mediated by SEDS and PBP Polymerase Families Functioning Semi-Autonomously." *Nature Microbiology* 1(10):16172.
- Chodiseti, Pavan Kumar, and Manjula Reddy. 2019. "Peptidoglycan Hydrolase of an Unusual Cross-Link Cleavage Specificity Contributes to Bacterial Cell Wall Synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(16):7825–30.

- Choi, Umji, and Chang Ro Lee. 2019. "Antimicrobial Agents That Inhibit the Outer Membrane Assembly Machines of Gram-Negative Bacteria." *J. Microbiol. Biotechnol.* 29(1):1–10.
- Cockran, Riana, Ronald Anderson, and Charles Feldman. 2002. "The Role of Pneumolysin in the Pathogenesis of Streptococcus Pneumoniae Infection." *Current Opinion in Infectious Diseases* 15(3):235–39.
- Cohen, S. P., L. M. McMurry, and S. B. Levy. 1988. "MarA Locus Causes Decreased Expression of OmpF Porin in Multiple-Antibiotic-Resistant (Mar) Mutants of Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 170(12):5416–22.
- Colomer-Winter, C., A. L. Flores-Mireles, S. Kundra, S. J. Hultgren, and J. A. Lemos. 2019. "(P)PpGpp and CodY Promote Enterococcus Faecalis Virulence in a Murine Model of Catheter-Associated Urinary Tract Infection." *MSphere* 4(4).
- Contreras-Martel, Carlos, Alexandre Martins, Chantal Ecobichon, Daniel Maragno Trindade, Pierre Jean Matteï, Samia Hicham, Pierre Hardouin, Meriem El Ghachi, Ivo G. Boneca, and Andréa Dessen. 2017. "Molecular Architecture of the PBP2-MreC Core Bacterial Cell Wall Synthesis Complex." *Nature Communications* 8(1).
- Correale, Stefania, Alessia Ruggiero, Rosanna Capparelli, Emilia Pedone, and Rita Berisio. 2013. "Structures of Free and Inhibited Forms of the L,D-Transpeptidase LdtMt1 from Mycobacterium Tuberculosis." *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 69(Pt 9):1697–1706.
- Corrigan, Rebecca M., Lauren E. Bellows, Alison Wood, and Angelika Gründling. 2016. "PpGpp Negatively Impacts Ribosome Assembly Affecting Growth and Antimicrobial Tolerance in Grampositive Bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(12):E1710–19.
- Coutinho, Pedro M., Emeline Deleury, Gideon J. Davies, and Bernard Henrissat. 2003. "An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases." *Journal of Molecular Biology* 328(2):307–17.
- Curtis, N. A. C., D. Orr, G. W. Ross, and M. G. Boulton. 1979. "Affinities of Penicillins and Cephalosporins for the Penicillin-Binding Proteins of Escherichia Coli K-12 and Their Antibacterial Activity." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 16(5):533–39.
- Dalebroux, Zachary D., Sarah L. Svensson, Erin C. Gaynor, and Michele S. Swanson. 2010. "PpGpp Conjures Bacterial Virulence." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 74(2):171.
- Dalhoff, Axel, and Christopher J. Thomson. 2003. "The Art of Fusion: From Penams and Cephems to Penems." *Chemotherapy* 49(3):105–20.
- Delhaye, Antoine, Jean François Collet, and Géraldine Laloux. 2016. "Fine-Tuning of the Cpx Envelope Stress Response Is Required for Cell Wall Homeostasis in Escherichia Coli." *MBio* 7(1):47–63.
- Delhaye, Antoine, Jean François Collet, and Géraldine Laloux. 2019. "A Fly on the Wall: How Stress Response Systems Can Sense and Respond to Damage to Peptidoglycan." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9.
- Delhaye, Antoine, Géraldine Laloux, and Jean François Collet. 2019. "The Lipoprotein NlpE Is a Cpx Sensor That Serves as a Sentinel for Protein Sorting and Folding Defects in the Escherichia Coli Envelope." *Journal of Bacteriology* 201(10).

- Demchick, Paul, and Arthur L. Koch. 1996. "The Permeability of the Wall Fabric of Escherichia Coli and Bacillus Subtilis." *Journal of Bacteriology* 178(3):768–73.
- Denome, Sylvia A., Pamela K. Elf, Thomas A. Henderson, David E. Nelson, and Kevin D. Young. 1999. "Escherichia Coli Mutants Lacking All Possible Combinations of Eight Penicillin Binding Proteins: Viability, Characteristics, and Implications for Peptidoglycan Synthesis." *Journal of Bacteriology* 181(13):3981–93.
- Domínguez-Escobar, Julia, Arnaud Chastanet, Alvaro H. Crevenna, Vincent Fromion, Roland Wedlich-Söldner, and Rut Carballido-López. 2011. "Processive Movement of MreB-Associated Cell Wall Biosynthetic Complexes in Bacteria." *Science* 333(6039):225–28.
- Doniselli, Nicola, Piere Rodriguez-Aliaga, Davide Amidani, Jorge A. Bardales, Carlos Bustamante, Daniel G. Guerra, and Claudio Rivetti. 2015. "New Insights into the Regulatory Mechanisms of PpGpp and DksA on Escherichia Coli RNA Polymerase-Promoter Complex." *Nucleic Acids Research* 43(10):5249–62.
- Doublet, P., J. Van Heijenoort, J. P. Bohin, and D. Mengin-Lecreulx. 1993. "The Murl Gene of Escherichia Coli Is an Essential Gene That Encodes a Glutamate Racemase Activity." *Journal of Bacteriology* 175(10):2970–79.
- Dramsi, Shaynoor, Sophie Magnet, Sophie Davison, and Michel Arthur. 2008. "Covalent Attachment of Proteins to Peptidoglycan." *FEMS Microbiology Reviews* 32(2):307–20.
- Du, Dijun, Xuan Wang-Kan, Arthur Neuberger, Hendrik W. van Veen, Klaas M. Pos, Laura J. V. Piddock, and Ben F. Luisi. 2018. "Multidrug Efflux Pumps: Structure, Function and Regulation." *Nature Reviews Microbiology* 2018 16:9 16(9):523–39.
- Du, Dijun, Zhao Wang, Nathan R. James, Jarrod E. Voss, Ewa Klimont, Thelma Ohene-Agyei, Henrietta Venter, Wah Chiu, and Ben F. Luisi. 2014. "Structure of the AcrAB–TolC Multidrug Efflux Pump." *Nature* 2014 509:7501 509(7501):512–15.
- Duncan, Kenneth, Jean van Heijenoort, and Christopher T. Walsh. 1990. "Purification and Characterization of the D-Alanyl-D-Alanine-Adding Enzyme from Escherichia Coli." *Biochemistry* 29(9):2379–86.
- Durfee, Tim, Anne Marie Hansen, Huijun Zhi, Frederick R. Blattner, and Jun Jin Ding. 2008. "Transcription Profiling of the Stringent Response in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 190(3):1084–96.
- Dutta, Dipak, Konstantin Shatalin, Vitaly Epshtein, Max E. Gottesman, and Evgeny Nudler. 2011. "Linking RNA Polymerase Backtracking to Genome Instability in E. Coli." *Cell* 146(4):533–43.
- Dutta, Noton K., Lee G. Klinkenberg, Maria Jesus Vazquez, Delfina Segura-Carro, Gonzalo Colmenarejo, Fernando Ramon, Beatriz Rodriguez-Miquel, Lydia Mata-Cantero, Esther Porrás De Francisco, Yu Min Chuang, Harvey Rubin, Jae Jin Lee, Hyungjin Eoh, Joel S. Bader, Esther Perez-Herran, Alfonso Mendoza-Losana, and Petros C. Karakousis. 2019. "Inhibiting the Stringent Response Blocks Mycobacterium Tuberculosis Entry into Quiescence and Reduces Persistence." *Science Advances* 5(3).
- Egan, Alexander J. F., Jacob Biboy, Inge van't Veer, Eefjan Breukink, and Waldemar Vollmer. 2015. "Activities and Regulation of Peptidoglycan Synthases." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370(1679):20150031.

- Egan, Alexander J. F., Jeff Errington, and Waldemar Vollmer. 2020. "Regulation of Peptidoglycan Synthesis and Remodelling." *Nature Reviews Microbiology* 18(8):446–60.
- Ehmann, David E., Haris Jahić, Philip L. Ross, Rong Fang Gu, Jun Hu, Gunther Kern, Grant K. Walkup, and Stewart L. Fisher. 2012. "Avibactam Is a Covalent, Reversible, Non- β -Lactam β -Lactamase Inhibitor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(29):11663–68.
- Emami, Kaveh, Aurelie Guyet, Yoshikazu Kawai, Jenny Devi, Ling J. Wu, Nick Allenby, Richard A. Daniel, and Jeff Errington. 2017. "RodA as the Missing Glycosyltransferase in *Bacillus Subtilis* and Antibiotic Discovery for the Peptidoglycan Polymerase Pathway." *Nature Microbiology* 2(3):1–9.
- Engel, Henk, Anne Marie van Leeuwen, Arnoud Dijkstra, and Wolfgang Keck. 1992. "Enzymatic Preparation of 1,6-Anhydro-Muropeptides by Immobilized Murein Hydrolases from *Escherichia Coli* Fused to Staphylococcal Protein A." *Applied Microbiology and Biotechnology* 37(6):772–83.
- Van Den Ent, Fusinita, Christopher M. Johnson, Logan Persons, Piet De Boer, and Jan Löwe. 2010. "Bacterial Actin MreB Assembles in Complex with Cell Shape Protein RodZ." *The EMBO Journal* 29(6):1081–90.
- Epshtein, Vitaly, Venu Kamarthapu, Katelyn McGary, Vladimir Svetlov, Beatrix Ueberheide, Sergey Proshkin, Alexander Mironov, and Evgeny Nudler. 2014. "UvrD Facilitates DNA Repair by Pulling RNA Polymerase Backwards." *Nature* 2014 505:7483 505(7483):372–77.
- Feng, Boya, Chandra Sekhar Mandava, Qiang Guo, Jie Wang, Wei Cao, Ningning Li, Yixiao Zhang, Yanqing Zhang, Zhixin Wang, Jiawei Wu, Suparna Sanyal, Jianlin Lei, and Ning Gao. 2014. "Structural and Functional Insights into the Mode of Action of a Universally Conserved Obg GTPase." *PLOS Biology* 12(5):e1001866.
- Ferullo, Daniel J., and Susan T. Lovett. 2008. "The Stringent Response and Cell Cycle Arrest in *Escherichia Coli*." *PLoS Genetics* 4(12).
- Fleming, Alexander. 1922. "On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 93(653):306–17.
- Fontana, R., M. Aldegheri, M. Ligozzi, H. Lopez, A. Sucari, and G. Satta. 1994. "Overproduction of a Low-Affinity Penicillin-Binding Protein and High-Level Ampicillin Resistance in *Enterococcus Faecium*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38(9):1980–83.
- Gallant, J., J. Irr, and M. Cashel. 1971. "The Mechanism of Amino Acid Control of Guanylate and Adenylyate Biosynthesis." *Journal of Biological Chemistry* 246(18):5812–16.
- Gamba, Pamela, Leendert W. Hamoen, and Richard A. Daniel. 2016. "Cooperative Recruitment of FtsW to the Division Site of *Bacillus Subtilis*." *Frontiers in Microbiology* 7(NOV):1808.
- Gan, Lu, Songye Chen, and Grant J. Jensen. 2008. "Molecular Organization of Gram-Negative Peptidoglycan." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(48):18953–57.
- García-Heredia, Alam, Amol Arunrao Pohane, Emily S. Melzer, Caleb R. Carr, Taylor J. Fiolek, Sarah R. Rundell, Hoong Chuin Lim, Jeffrey C. Wagner, Yasu S. Morita, Benjamin M. Swarts, and M. Sloan Siegrist. 2018. "Peptidoglycan Precursor Synthesis along the Sidewall of Pole-Growing

Mycobacteria." *ELife* 7.

- Garcia del Portillo, Francisco, Miguel A De Pedro, F. Garcia Del Portillo, M A De Pedro, D. Joseleau-Petit, R. D'ari, and J. Bacteriol. 1990. "Differential Effect of Mutational Impairment of Penicillin-Binding Proteins 1A and 1B on Escherichia Coli Strains Harboring Thermosensitive Mutations in the Cell Division Genes FtsA, FtsQ, FtsZ, and PbpB." *Journal of Bacteriology* 172(10):5863–70.
- Garner, Ethan C., Remi Bernard, Wenqin Wang, Xiaowei Zhuang, David Z. Rudner, and Tim Mitchison. 2011. "Coupled, Circumferential Motions of the Cell Wall Synthesis Machinery and MreB Filaments in *B. Subtilis*." *Science* 333(6039):222–25.
- Geiger, Tobias, Benjamin Kästle, Fabio Lino Gratani, Christiane Goerke, and Christiane Wolz. 2014. "Two Small (p)PpGpp Synthases in *Staphylococcus Aureus* Mediate Tolerance against Cell Envelope Stress Conditions." *Journal of Bacteriology* 196(4):894–902.
- Geiger, Tobias, Manuel Pazos, Maria Lara-Tejero, Waldemar Vollmer, and Jorge E. Galán. 2018. "Peptidoglycan Editing by a Specific LD-Transpeptidase Controls the Muramidase-Dependent Secretion of Typhoid Toxin." *Nature Microbiology* 3(11):1243–54.
- Geiger, Tobias, and Christiane Wolz. 2014. "Intersection of the Stringent Response and the CodY Regulon in Low GC Gram-Positive Bacteria." *International Journal of Medical Microbiology : IJMM* 304(2):150–55.
- Gerding, Matthew A., Yasuyuki Ogata, Nicole D. Pecora, Hironori Niki, and Piet A. J. De Boer. 2007. "The Trans-Envelope Tol-Pal Complex Is Part of the Cell Division Machinery and Required for Proper Outer-Membrane Invagination during Cell Constriction in *E. Coli*." *Molecular Microbiology* 63(4):1008–25.
- Germain, Elsa, Paul Guiraud, Deborah Byrne, Badreddine Douzi, Meriem Djendli, and Etienne Maisonneuve. 2019. "YtfK Activates the Stringent Response by Triggering the Alarmone Synthetase SpoT in *Escherichia Coli*." *Nature Communications* 2019 10:1 10(1):1–12.
- El Ghachi, Meriem, Ahmed Bouhss, H el ene Barreteau, Thierry Touz e, Genevi eve Auger, Didier Blanot, and Dominique Mengin-Lecreux. 2006. "Colicin M Exerts Its Bacteriolytic Effect via Enzymatic Degradation of Undecaprenyl Phosphate-Linked Peptidoglycan Precursors." *The Journal of Biological Chemistry* 281(32):22761–72.
- Ghuysen, J. M. 1968. "Use of Bacteriolytic Enzymes in Determination of Wall Structure and Their Role in Cell Metabolism." *Bacteriological Reviews* 32(4 Pt 2):425.
- Glauner, B., J. V. Holtje, and U. Schwarz. 1988. "The Composition of the Murein of *Escherichia Coli*." *Journal of Biological Chemistry* 263(21):10088–95.
- Glauner, Bernd. 1988. "Separation and Quantification of Muropeptides with High-Performance Liquid Chromatography." *Analytical Biochemistry* 172(2):451–64.
- Goffin, Colette, and Jean-Marie Ghuysen. 1998. "Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic Family of Orthologs and Paralogs." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 62(4):1079–93.
- Gonzalez-Leiza, S. M., Miguel A. de Pedro, and Juan A. Ayala. 2011. "AmpH, a Bifunctional DD-Endopeptidase and DD-Carboxypeptidase of *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 193(24):6887–94.

- Gratani, Fabio Lino, Petra Horvatek, Tobias Geiger, Marina Borisova, Christoph Mayer, Iwan Grin, Samuel Wagner, Wieland Steinchen, Gert Bange, Ana Velic, Boris Maček, and Christiane Wolz. 2018. "Regulation of the Opposing (p)PpGpp Synthetase and Hydrolase Activities in a Bifunctional RelA/SpoT Homologue from *Staphylococcus Aureus*." *PLOS Genetics* 14(7):e1007514.
- Gray, Andrew N., Alexander J. F. Egan, Inge L. van't Veer, Jolanda Verheul, Alexandre Colavin, Alexandra Koumoutsis, Jacob Biboy, Maarten A. F. Altelaar, Mirjam J. Damen, Kerwyn Casey Huang, Jean Pierre Simorre, Eefjan Breukink, Tanneke den Blaauwen, Athanasios Typas, Carol A. Gross, and Waldemar Vollmer. 2015. "Coordination of Peptidoglycan Synthesis and Outer Membrane Constriction during *Escherichia Coli* Cell Division." *ELife* 4(MAY).
- Gupta, Radhey S. 1998. "Protein Phylogenies and Signature Sequences: A Reappraisal of Evolutionary Relationships among Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(4):1435.
- Gurnani Serrano, Carlos K., Matthias Winkle, Alessandra M. Martorana, Jacob Biboy, Niccolo Morè, Patrick Moynihan, Manuel Banzhaf, Waldemar Vollmer, and Alessandra Polissi. 2021. "ActS Activates Peptidoglycan Amidases during Outer Membrane Stress in *Escherichia Coli*." *Molecular Microbiology* 116(1):329–42.
- Gutierrez, A., L. Laureti, S. Crussard, H. Abida, A. Rodríguez-Rojas, J. Blázquez, Z. Baharoglu, D. Mazel, F. Darfeuille, J. Vogel, and I. Matic. 2013. "β-Lactam Antibiotics Promote Bacterial Mutagenesis via an RpoS-Mediated Reduction in Replication Fidelity." *Nature Communications* 2013 4:1 4(1):1–9.
- Hantke, Klaus, and Volkmar Braun. 1973. "Covalent Binding of Lipid to Protein. Diglyceride and Amide-Linked Fatty Acid at the N-Terminal End of the Murein-Lipoprotein of the *Escherichia Coli* Outer Membrane." *European Journal of Biochemistry* 34(2):284–96.
- Hara, Akira, and Jose Sy. 1983. "Guanosine 5'-Triphosphate, 3'-Diphosphate 5'-Phosphohydrolase. Purification and Substrate Specificity." *The Journal of Biological Chemistry* 258(3):1678–83.
- Hartman, B. J., and A. Tomasz. 1984. "Low-Affinity Penicillin-Binding Protein Associated with Beta-Lactam Resistance in *Staphylococcus Aureus*." *Journal of Bacteriology* 158(2):513.
- Haugen, Shanil P., Melanie B. Berkmen, Wilma Ross, Tamas Gaal, Christopher Ward, and Richard L. Gourse. 2006. "RRNA Promoter Regulation by Nonoptimal Binding of σ Region 1.2: An Additional Recognition Element for RNA Polymerase." *Cell* 125(6):1069–82.
- Healy, Claire, Alexandre Gouzy, and Sabine Ehrh. 2020. "Peptidoglycan Hydrolases RipA and Ami1 Are Critical for Replication and Persistence of *Mycobacterium Tuberculosis* in the Host." *MBio* 11(2).
- Heaslet, Holly, Bailin Shaw, Anil Mistry, and Alita A. Miller. 2009. "Characterization of the Active Site of *S. Aureus* Monofunctional Glycosyltransferase (Mtg) by Site-Directed Mutation and Structural Analysis of the Protein Complexed with Moenomycin." *Journal of Structural Biology* 167(2):129–35.
- Heidrich, Christoph, Markus F. Templin, Astrid Ursinus, Melisa Merdanovic, Jürgen Berger, Heinz Schwarz, Miguel A. De Pedro, and Joachim Volker Höltje. 2001. "Involvement of N-Acetylmuramyl-L-Alanine Amidases in Cell Separation and Antibiotic-Induced Autolysis of *Escherichia Coli*." *Molecular Microbiology* 41(1):167–78.
- Heidrich, Christoph, Astrid Ursinus, Jürgen Berger, Heinz Schwarz, and Joachim Volker Höltje. 2002. "Effects of Multiple Deletions of Murein Hydrolases on Viability, Septum Cleavage, and Sensitivity to Large Toxic Molecules in *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 184(22):6093–99.

- Henderson, T. A., P. M. Dombrosky, and K. D. Young. 1994. "Artifactual Processing of Penicillin-Binding Proteins 7 and 1b by the OmpT Protease of Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 176(1):256–59.
- Henriques, Adriano O., Philippe Glaser, Patrick J. Piggot, and Charles P. Moran. 1998. "Control of Cell Shape and Elongation by the RodA Gene in Bacillus Subtilis." *Molecular Microbiology* 28(2):235–47.
- Hesek, Dusan, Mijoon Lee, Weilie Zhang, Bruce C. Noll, and Shahriar Mobashery. 2009. "Total Synthesis of N-Acetylglucosamine-1,6-Anhydro-N-Acetylmuramylpentapeptide and Evaluation of Its Turnover by AmpD from Escherichia Coli." *Journal of the American Chemical Society* 131(14):5187–93.
- Ho, Hoangdung, Anh Miu, Mary Kate Alexander, Natalie K. Garcia, Angela Oh, Inna Zilberleyb, Mike Reichelt, Cary D. Austin, Christine Tam, Stephanie Shriver, Huiyong Hu, Sharada S. Labadie, Jun Liang, Lan Wang, Jian Wang, Yan Lu, Hans E. Purkey, John Quinn, Yvonne Franke, Kevin Clark, Maureen H. Beresini, Man Wah Tan, Benjamin D. Sellers, Till Maurer, Michael F. T. Koehler, Aaron T. Weckler, James R. Kiefer, Vishal Verma, Yiming Xu, Mireille Nishiyama, Jian Payandeh, and Christopher M. Koth. 2018. "Structural Basis for Dual-Mode Inhibition of the ABC Transporter MsbA." *Nature* 557(7704):196–201.
- Hochstadt-Ozer, Joy, and Michael Cashel. 1972. "The Regulation of Purine Utilization in Bacteria V. Inhibition of Purine Phosphoribosyltransferase Activities and Purine Uptake in Isolated Membrane Vesicles by Guanosine Tetrphosphate." *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 247(21):7067–72.
- Hogg, Tanis, Undine Mechold, Horst Malke, Mike Cashel, and Rolf Hilgenfeld. 2004. "Conformational Antagonism between Opposing Active Sites in a Bifunctional RelA/SpoT Homolog Modulates (p)PpGpp Metabolism during the Stringent Response." *Cell* 117(1):57–68.
- Höltje, J. V., D. Mirelman, N. Sharon, and U. Schwarz. 1975. "Novel Type of Murein Transglycosylase in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 124(3):1067–76.
- Höltje, J. V. 1998. "Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of Escherichia Coli." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 62(1):181–203.
- Höltje, J. V, and C. Heidrich. 2001. "Enzymology of Elongation and Constriction of the Murein Sacculus of Escherichia Coli." *Biochimie* 83(1):103–8.
- Höltje, Joachim Volker, Ursula Kopp, Astrid Ursinus, and Bernd Wiedemann. 1994. "The Negative Regulator of Beta-Lactamase Induction AmpD Is a N-Acetyl-Anhydromuramyl-L-Alanine Amidase." *FEMS Microbiology Letters* 122(1–2):159–64.
- Hou, Zhenglin, Michael Cashel, Herbert J. Fromm, and Richard B. Honzatko. 1999. "Effectors of the Stringent Response Target the Active Site of Escherichia Coli Adenylosuccinate Synthetase." *The Journal of Biological Chemistry* 274(25):17505–10.
- Huang, Chia Ying, Hao Wei Shih, Li Ying Lin, Yi Wen Tien, Ting Jen Rachel Cheng, Wei Chieh Cheng, Chi Huey Wong, and Che Ma. 2012. "Crystal Structure of Staphylococcus Aureus Transglycosylase in Complex with a Lipid II Analog and Elucidation of Peptidoglycan Synthesis Mechanism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(17):6496–6501.
- Hugonnet, Jean Emmanuel, Nabila Haddache, Carole Veckerlé, Lionel Dubost, Arul Marie, Noriyasu Shikura, Jean Luc Mainardi, Louis B. Rice, and Michel Arthur. 2014. "Peptidoglycan Cross-Linking in Glycopeptide-Resistant Actinomycetales." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(3):1749–56.

- Hugonnet, Jean Emmanuel, Dominique Mengin-Lecreux, Alejandro Monton, Tanneke den Blaauwen, Etienne Carbonnelle, Carole Veckerlé, V. Brun Yves, Michael van Nieuwenhze, Christiane Bouchier, Kuyek Tu, Louis B. Rice, and Michel Arthur. 2016. "Factors Essential for L,D-Transpeptidase-Mediated Peptidoglycan Cross-Linking and β -Lactam Resistance in Escherichia Coli." *ELife* 5(OCTOBER2016).
- Hugonnet, Jean Emmanuel, Lee W. Tremblay, Helena I. Boshoff, Clifton E. Barry, and John S. Blanchard. 2009. "Meropenem-Clavulanate Is Effective against Extensively Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis." *Science* 323(5918):1215–18.
- Hvorup, Rikki N., Brit Winnen, Abraham B. Chang, Yong Jiang, Xiao Feng Zhou, and Milton H. Saier. 2003. "The Multidrug/Oligosaccharidyl-Lipid/Polysaccharide (MOP) Exporter Superfamily." *European Journal of Biochemistry* 270(5):799–813.
- Ikedo, M., M. Wachi, H. K. Jung, F. Ishino, and M. Matsushashi. 1991. "The Escherichia Coli MraY Gene Encoding UDP-N-Acetylmuramoyl-Pentapeptide: Undecaprenyl-Phosphate Phospho-N-Acetylmuramoyl-Pentapeptide Transferase." *Journal of Bacteriology* 173(3):1021–26.
- Imada, A., K. Kitano, K. Kintaka, M. Muroi, and M. Asai. 1981. "Sulfazecin and Isosulfazecin, Novel β -Lactam Antibiotics of Bacterial Origin." *Nature* 1981 289:5798 289(5798):590–91.
- Inoue, Azusa, Yoshimitsu Murata, Hiroshi Takahashi, Naoko Tsuji, Shingo Fujisaki, and Jun Ichi Kato. 2008. "Involvement of an Essential Gene, MviN, in Murein Synthesis in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 190(21):7298–7301.
- Ishihama, Akira. 2018. "Building a Complete Image of Genome Regulation in the Model Organism Escherichia Coli." *The Journal of General and Applied Microbiology* 63(6):311–24.
- Izutsu, Kaori, Akira Wada, and Chieko Wada. 2001. "Expression of Ribosome Modulation Factor (RMF) in Escherichia Coli Requires PpGpp." *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 6(8):665–76.
- Jacobs, Christine, Li Jun Huang, Eveline Bartowsky, Staffan Normark, and James T. Park. 1994. "Bacterial Cell Wall Recycling Provides Cytosolic Muropeptides as Effectors for Beta-Lactamase Induction." *The EMBO Journal* 13(19):4684–94.
- Jacoby, George A. 2009. "AmpC Beta-Lactamases." *Clinical Microbiology Reviews* 22(1):161–82.
- Jimmy, Steffi, Chayan Kumar Saha, Tatsuaki Kurata, Constantine Stavropoulos, Sofia Raquel Alves Oliveira, Alan Koh, Albinas Cepauskas, Hiraku Takada, Dominik Rejman, Tanel Tenson, Henrik Strahl, Abel Garcia-Pino, Vasili Haurlyuk, and Gemma C. Atkinson. 2020. "A Widespread Toxin-antitoxin System Exploiting Growth Control via Alarmone Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(19):10500–510.
- Jishage, Miki, Kristian Kvint, Victoria Shingler, and Thomas Nyström. 2002. "Regulation of Sigma Factor Competition by the Alarmone PpGpp." *Genes & Development* 16(10):1260–70.
- Johnson, Jarrod W., Jed F. Fisher, and Shahriar Mobashery. 2013. "Bacterial Cell-Wall Recycling." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1277(1):54–75.
- Jones, Laura J. F., Rut Carballido-López, and Jeffery Errington. 2001. "Control of Cell Shape in Bacteria: Helical, Actin-like Filaments in Bacillus Subtilis." *Cell* 104(6):913–22.
- De Jonge, B. L. M., F. B. Wientjes, I. Jurida, F. Driehuis, J. T. M. Wouters, and N. Nanninga. 1989.

- “Peptidoglycan Synthesis during the Cell Cycle of Escherichia Coli: Composition and Mode of Insertion.” *Journal of Bacteriology* 171(11):5783–94.
- Jorgenson, Matthew A., Yan Chen, Atsushi Yahashiri, David L. Popham, and David S. Weiss. 2014. “The Bacterial Septal Ring Protein RlpA Is a Lytic Transglycosylase That Contributes to Rod Shape and Daughter Cell Separation in *Pseudomonas Aeruginosa*.” *Molecular Microbiology* 93(1):113–28.
- Kahan, Frederick M., Jean S. Kahan, Patrick J. Cassidy, and Helmut Kropp. 1974. “THE MECHANISM OF ACTION OF FOSFOMYCIN (PHOSPHONOMYCIN).” *Annals of the New York Academy of Sciences* 235(1):364–86.
- Kamarthapu, Venu, Vitaly Epshtein, Bradley Benjamin, Sergey Proshkin, Alexander Mironov, Michael Cashel, and Evgeny Nudler. 2016. “PpGpp Couples Transcription to DNA Repair in *E. Coli*.” *Science* 352(6288):993–96.
- Kästle, Benjamin, Tobias Geiger, Fabio Lino Gratani, Rudolf Reisinger, Christiane Goerke, Marina Borisova, Christoph Mayer, and Christiane Wolz. 2015. “RRNA Regulation during Growth and under Stringent Conditions in *Staphylococcus Aureus*.” *Environmental Microbiology* 17(11):4394–4405.
- Kawai, Yoshikazu, Romain Mercier, Katarzyna Mickiewicz, Agnese Serafini, Luiz Pedro Sório de Carvalho, and Jeff Errington. 2019. “Crucial Role for Central Carbon Metabolism in the Bacterial L-Form Switch and Killing by β -Lactam Antibiotics.” *Nature Microbiology* 2019 4:10 4(10):1716–26.
- Kazmierczak, Krystyna M., Kyle J. Wayne, Andreas Rechtsteiner, and Malcolm E. Winkler. 2009. “Roles of RelSpn in Stringent Response, Global Regulation, and Virulence of Serotype 2 *Streptococcus Pneumoniae* D39.” *Molecular Microbiology* 72(3):590.
- Keasling, J. D., L. Bertsch, and A. Kornberg. 1993. “Guanosine Pentaphosphate Phosphohydrolase of *Escherichia Coli* Is a Long-Chain Exopolyphosphatase.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(15):7029–33.
- Keck, W., and U. Schwarz. 1979. “*Escherichia Coli* Murein-DD-Endopeptidase Insensitive to Beta-Lactam Antibiotics.” *Journal of Bacteriology* 139(3):770–74.
- Kihira, Kiyohito, Yoshihiro Shimizu, Yasuhito Shomura, Naoki Shibata, Masaya Kitamura, Atsushi Nakagawa, Takuya Ueda, Kozo Ochi, and Yoshiki Higuchi. 2012. “Crystal Structure Analysis of the Translation Factor RF3 (Release Factor 3).” *FEBS Letters* 586(20):3705–9.
- King, Dustin T., Gregory A. Wasney, Michael Nosella, Anita Fong, Natalie C. J. Strynadka, and F. Peter Guengerich. 2017. “Structural Insights into Inhibition of *Escherichia Coli* Penicillin-Binding Protein 1B.” *The Journal of Biological Chemistry* 292(3):979–93.
- Kingston, R. E., W. C. Nierman, and M. J. Chamberlin. 1981. “A Direct Effect of Guanosine Tetraphosphate on Pausing of *Escherichia Coli* RNA Polymerase during RNA Chain Elongation.” *Journal of Biological Chemistry* 256(6):2787–97.
- Kireeva, Maria L., Yuri A. Nedialkov, Gina H. Cremona, Yuri A. Purtov, Lucyna Lubkowska, Francisco Malagon, Zachary F. Burton, Jeffrey N. Strathern, and Mikhail Kashlev. 2008. “Transient Reversal of RNA Polymerase II Active Site Closing Controls Fidelity of Transcription Elongation.” *Molecular Cell* 30(5):557–66.
- Klare, I., A. C. Rodloff, J. Wagner, W. Witte, and R. Hakenbeck. 1992. “Overproduction of a Penicillin-Binding Protein Is Not the Only Mechanism of Penicillin Resistance in *Enterococcus Faecium*.”

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 36(4):783–87.

- Kocaoglu, Ozden, and Erin E. Carlson. 2015. "Profiling of β -Lactam Selectivity for Penicillin-Binding Proteins in Escherichia Coli Strain DC2." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(5):2785–90.
- Kohanski, Michael A., Mark A. DePristo, and James J. Collins. 2010. "Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis." *Molecular Cell* 37(3):311–20.
- Kohlrausch, U., and J. V. Holtje. 1991. "Analysis of Murein and Murein Precursors during Antibiotic-Induced Lysis of Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 173(11):3425–31.
- Kong, Kok Fai, Lisa Schneper, and Kalai Mathee. 2010. "Beta-Lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology." *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 118(1):1.
- Koraimann, G. 2003. "Lytic Transglycosylases in Macromolecular Transport Systems of Gram-Negative Bacteria." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2003 60:11 60(11):2371–88.
- Korat, B., H. Mottl, and W. Keck. 1991. "Penicillin-Binding Protein 4 of Escherichia Coli: Molecular Cloning of the DacB Gene, Controlled Overexpression, and Alterations in Murein Composition." *Molecular Microbiology* 5(3):675–84.
- Kraemer, James A., Allen G. Sanderlin, and Michael T. Laub. 2019. "The Stringent Response Inhibits DNA Replication Initiation in E. Coli by Modulating Supercoiling of OriC." *MBio* 10(4).
- Krásny, Libor, and Richard L. Gourse. 2004. "An Alternative Strategy for Bacterial Ribosome Synthesis: Bacillus Subtilis rRNA Transcription Regulation." *The EMBO Journal* 23(22):4473–83.
- Kriel, Allison, Alycia N. Bittner, Sok Ho Kim, Kuanqing Liu, Ashley K. Tehranchi, Winnie Y. Zou, Samantha Rendon, Rui Chen, Benjamin P. Tu, and Jue D. Wang. 2012. "Direct Regulation of GTP Homeostasis by (p)PpGpp: A Critical Component of Viability and Stress Resistance." *Molecular Cell* 48(2):231–41.
- Krishnan, Sushma, Anushya Petchiappan, Albel Singh, Apoorva Bhatt, and Dipankar Chatterji. 2016. "R-Loop Induced Stress Response by Second (p)PpGpp Synthetase in Mycobacterium Smegmatis: Functional and Domain Interdependence." *Molecular Microbiology* 102(1):168–82.
- Krohn, Michael, and Rolf Wagner. 1996. "Transcriptional Pausing of RNA Polymerase in the Presence of Guanosine Tetraphosphate Depends on the Promoter and Gene Sequence." *Journal of Biological Chemistry* 271(39):23884–94.
- Kruse, Thomas, Jette Bork-Jensen, and Kenn Gerdes. 2005. "The Morphogenetic MreBCD Proteins of Escherichia Coli Form an Essential Membrane-Bound Complex." *Molecular Microbiology* 55(1):78–89.
- Kudrin, Pavel, Ievgen Dzhygyr, Kensuke Ishiguro, Jelena Beljantseva, Elena Maksimova, Sofia Raquel Alves Oliveira, Vallo Varik, Roshani Payoe, Andrey L. Konevega, Tanel Tenson, Tsutomu Suzuki, and Vasili Haurlyiuk. 2018. "The Ribosomal A-Site Finger Is Crucial for Binding and Activation of the Stringent Factor RelA." *Nucleic Acids Research* 46(4):1973.
- Kuk, Alvin C. Y., Ellene H. Mashalidis, and Seok Yong Lee. 2017. "Crystal Structure of the MOP Flippase MurJ in an Inward-Facing Conformation." *Nature Structural & Molecular Biology* 24(2):171–76.
- Kumar, Pankaj, Varsha Chauhan, José Rogério A. Silva, Jerônimo Lameira, Felipe B. D'Andrea, Shao Gang Li, Stephan L. Ginell, Joel S. Freundlich, Cláudio Nahum Alves, Scott Bailey, Keira A. Cohen, and

- Gyanu Lamichhane. 2017. "Mycobacterium Abscessus L,d-Transpeptidases Are Susceptible to Inactivation by Carbapenems and Cephalosporins but Not Penicillins." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61(10).
- Kumar, Pradeep, Kriti Arora, John R. Lloyd, Ill Y. Lee, Vinod Nair, Elizabeth Fischer, Helena I. M. Boshoff, and Clifton E. Barry. 2012. "Meropenem Inhibits D,D-Carboxypeptidase Activity in Mycobacterium Tuberculosis." *Molecular Microbiology* 86(2):367–81.
- Kuru, Erkin, H. Velocity Hughes, Pamela J. Brown, Edward Hall, Srinivas Tekkam, Felipe Cava, Miguel A. De Pedro, Yves V. Brun, and Michael S. Vannieuwenhze. 2012. "In Situ Probing of Newly Synthesized Peptidoglycan in Live Bacteria with Fluorescent D-Amino Acids." *Angewandte Chemie International Edition* 51(50):12519–23.
- Lai, Ghee Chuan, Hongbaek Cho, and Thomas G. Bernhardt. 2017. "The Mecillinam Resistome Reveals a Role for Peptidoglycan Endopeptidases in Stimulating Cell Wall Synthesis in Escherichia Coli" edited by D. Hughes. *PLOS Genetics* 13(7):e1006934.
- Lam, Hubert, Dong Chan Oh, Felipe Cava, Constantin N. Takacs, Jon Clardy, Miguel A. De Pedro, and Matthew K. Waldor. 2009. "D-Amino Acids Govern Stationary Phase Cell Wall Re-Modeling in Bacteria." *Science* 325(5947):1552.
- Lambert, Peter A. 2005. "Bacterial Resistance to Antibiotics: Modified Target Sites." *Advanced Drug Delivery Reviews* 57(10):1471–85.
- Lavigne, Jean Philippe, Albert Sotto, Marie H el ene Nicolas-Chanoine, Nicole Bouziges, Jean Marie Pag es, and Anne Davin-Regli. 2013. "An Adaptive Response of Enterobacter Aerogenes to Imipenem: Regulation of Porin Balance in Clinical Isolates." *International Journal of Antimicrobial Agents* 41(2):130–36.
- Lavollay, Marie, Michel Arthur, Martine Fourgeaud, Lionel Dubost, Arul Marie, Philippe Riegel, Laurent Gutmann, and Jean Luc Mainardi. 2009. "The Beta-Lactam-Sensitive D,D-Carboxypeptidase Activity of Pbp4 Controls the L,D and D,D Transpeptidation Pathways in Corynebacterium Jeikeium." *Molecular Microbiology* 74(3):650–61.
- Lavollay, Marie, Michel Arthur, Martine Fourgeaud, Lionel Dubost, Arul Marie, Nicolas Veziris, Didier Blanot, Laurent Gutmann, and Jean Luc Mainardi. 2008. "The Peptidoglycan of Stationary-Phase Mycobacterium Tuberculosis Predominantly Contains Cross-Links Generated by L,D-Transpeptidation." *Journal of Bacteriology* 190(12):4360–66.
- Lavollay, Marie, Martine Fourgeaud, Jean Louis Herrmann, Lionel Dubost, Arul Marie, Laurent Gutmann, Michel Arthur, and Jean Luc Mainardi. 2011. "The Peptidoglycan of Mycobacterium Abscessus Is Predominantly Cross-Linked by L,d-Transpeptidases." *Journal of Bacteriology* 193(3):778.
- Leclercq, Sophie, Adeline Derouaux, Samir Olatunji, Claudine Fraipont, Alexander J. F. Egan, Waldemar Vollmer, Eefjan Breukink, and Mohammed Terrak. 2017. "Interplay between Penicillin-Binding Proteins and SEDS Proteins Promotes Bacterial Cell Wall Synthesis." *Scientific Reports* 7.
- Lee, Anna J., Shangying Wang, Hannah R. Meredith, Bihan Zhuang, Zhuojun Dai, and Lingchong You. 2018. "Robust, Linear Correlations between Growth Rates and β -Lactam-Mediated Lysis Rates." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(16):4069–74.
- Lee, Jae Woo, Young Ha Park, and Yeong Jae Seok. 2018. "Rsd Balances (p)PpGpp Level by Stimulating the Hydrolase Activity of SpoT during Carbon Source Downshift in Escherichia Coli." *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(29):E6845–54.
- Lee, Mijoon, María T. Batuecas, Shusuke Tomoshige, Teresa Domínguez-Gil, Kiran V. Mahasenan, David A. Dik, Dusan Heseck, Claudia Millán, Isabel Usón, Elena Lastochkin, Juan A. Hermoso, and Shahriar Mobashery. 2018. “Exolytic and Endolytic Turnover of Peptidoglycan by Lytic Transglycosylase Slt of *Pseudomonas Aeruginosa*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(17):4393–98.
- Lee, Mijoon, Dusan Heseck, Leticia I. Llarrull, Elena Lastochkin, Hualiang Pi, Bill Boggess, and Shahriar Mobashery. 2013. “Reactions of All *Escherichia Coli* Lytic Transglycosylases with Bacterial Cell Wall.” *Journal of the American Chemical Society* 135(9):3311–14.
- Lemke, Justin J., Tim Durfee, and Richard L. Gourse. 2009. “DksA and PpGpp Directly Regulate Transcription of the *Escherichia Coli* Flagellar Cascade.” *Molecular Microbiology* 74(6):1368.
- Lemke, Justin J., Patricia Sanchez-Vazquez, Hector L. Burgos, Gina Hedberg, Wilma Ross, and Richard L. Gourse. 2011. “Direct Regulation of *Escherichia Coli* Ribosomal Protein Promoters by the Transcription Factors PpGpp and DksA.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(14):5712–17.
- Lenz, Jonathan D., Kathleen T. Hackett, and Joseph P. Dillard. 2017. “A Single Dual-Function Enzyme Controls the Production of Inflammatory NOD Agonist Peptidoglycan Fragments by *Neisseria Gonorrhoeae*.” *MBio* 8(5).
- Levin, Bruce R., Ingrid C. McCall, Véronique Perrot, Howard Weiss, Armen Ovesepian, and Fernando Baquero. 2017. “A Numbers Game: Ribosome Densities, Bacterial Growth, and Antibiotic-Mediated Stasis and Death.” *MBio* 8(1).
- Liger, Dominique, Anne Masson, Didier Blanot, Jean Van Heijenoort, and Claudine Parquet. 1995. “Over-Production, Purification and Properties of the Uridine-Diphosphate-N -Acetylmuramate: L-Alanine Ligase from *Escherichia Coli*.” *European Journal of Biochemistry* 230(1):80–87.
- Lima, Lidia Moreira, Bianca Nascimento Monteiro da Silva, Gisele Barbosa, and Eliezer J. Barreiro. 2020. “ β -Lactam Antibiotics: An Overview from a Medicinal Chemistry Perspective.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 208.
- Van der Linden, M. P. G., L. De Haan, M. A. Hoyer, and W. Keck. 1992. “Possible Role of *Escherichia Coli* Penicillin-Binding Protein 6 in Stabilization of Stationary-Phase Peptidoglycan.” *Journal of Bacteriology* 174(23):7572–78.
- Lindman, Marissa, and Thomas Dick. 2019. “Bedaquiline Eliminates Bactericidal Activity of β -Lactams against *Mycobacterium Abscessus*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63(8).
- Ling, Losee L., Tanja Schneider, Aaron J. Peoples, Amy L. Spoering, Ina Engels, Brian P. Conlon, Anna Mueller, Till F. Schäberle, Dallas E. Hughes, Slava Epstein, Michael Jones, Linos Lazarides, Victoria A. Steadman, Douglas R. Cohen, Cintia R. Felix, K. Ashley Fetterman, William P. Millett, Anthony G. Nitti, Ashley M. Zullo, Chao Chen, and Kim Lewis. 2015. “A New Antibiotic Kills Pathogens without Detectable Resistance.” *Nature* 517(7535):455–59.
- Liu, Kuanqing, Angela R. Myers, Tippapha Pisithkul, Kathy R. Claas, Kenneth A. Satyshur, Daniel Amador-Noguez, James L. Keck, and Jue D. Wang. 2015. “Molecular Mechanism and Evolution of Guanylate Kinase Regulation by (p)PpGpp.” *Molecular Cell* 57(4):735–49.

- Liu, Xiaolong, Nils Y. Meiresonne, Ahmed Bouhss, and Tanneke den Blaauwen. 2018. "FtsW Activity and Lipid II Synthesis Are Required for Recruitment of MurJ to Midcell during Cell Division in *Escherichia Coli*." *Molecular Microbiology* 109(6):855–84.
- Lobritz, Michael A., Ian W. Andrews, Dana Braff, Caroline B. M. Porter, Arnaud Gutierrez, Yoshikazu Furuta, Louis B. G. Cortes, Thomas Ferrante, Sarah C. Bening, Felix Wong, Charley Gruber, Christopher W. Bakerlee, Guillaume Lambert, Graham C. Walker, Daniel J. Dwyer, and James J. Collins. 2022. "Increased Energy Demand from Anabolic-Catabolic Processes Drives β -Lactam Antibiotic Lethality." *Cell Chemical Biology* 29(2):276-286.e4.
- Lommatszsch, Jürgen, Markus F. Templin, Angelika R. Kraft, Waldemar Vollmer, and And Joachim Volker Höltje. 1997. "Outer Membrane Localization of Murein Hydrolases: MltA, a Third Lipoprotein Lytic Transglycosylase in *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 179(17):5465–70.
- Loveland, Anna B., Eugene Bah, Rohini Madireddy, Ying Zhang, Axel F. Brilot, Nikolaus Grigorieff, and Andrei A. Korostelev. 2016. "Ribosome.RelA Structures Reveal the Mechanism of Stringent Response Activation." *ELife* 5(JULY).
- Lovering, Andrew L., Liza H. De Castro, Daniel Lim, and Natalie C. J. Strynadka. 2007. "Structural Insight into the Transglycosylation Step of Bacterial Cell-Wall Biosynthesis." *Science* 315(5817):1402–5.
- Lynch, Joseph P., Nina M. Clark, and George G. Zhanel. 2013. "Evolution of Antimicrobial Resistance among Enterobacteriaceae (Focus on Extended Spectrum β -Lactamases and Carbapenemases)." *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 14(2):199–210.
- Maciag, Monika, Maja Kochanowska, Robert Łyżeń, Grzegorz Wegrzyn, and Agnieszka Szalewska-Pałasz. 2010. "PpGpp Inhibits the Activity of *Escherichia Coli* DnaG Primase." *Plasmid* 63(1):61–67.
- Magnan, David, and David Bates. 2015. "Regulation of DNA Replication Initiation by Chromosome Structure." *Journal of Bacteriology* 197(21):3370–77.
- Magnet, Sophie, Samuel Bellais, Lionel Dubost, Martine Fourgeaud, Jean Luc Mainardi, Sébastien Petit-Frère, Arul Marie, Dominique Mengin-Lecreux, Michel Arthur, and Laurent Gutmann. 2007. "Identification of the L,D-Transpeptidases Responsible for Attachment of the Braun Lipoprotein to *Escherichia Coli* Peptidoglycan." *Journal of Bacteriology* 189(10):3927–31.
- Magnet, Sophie, Lionel Dubost, Arul Marie, Michel Arthur, and Laurent Gutmann. 2008. "Identification of the L,D-Transpeptidases for Peptidoglycan Cross-Linking in *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 190(13):4782–85.
- Magnusson, Lisa U., Bertil Gummesson, Predrag Joksimović, Anne Farewell, and Thomas Nyström. 2007. "Identical, Independent, and Opposing Roles of PpGpp and DksA in *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 189(14):5193–5202.
- Maguire, Bruce A. 2009. "Inhibition of Bacterial Ribosome Assembly: A Suitable Drug Target?" *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73(1):22–35.
- Mainardi, Jean Luc, Martine Fourgeaud, Jean Emmanuel Hugonnet, Lionel Dubost, Jean Paul Brouard, Jamal Ouazzani, Louis B. Rice, Laurent Gutmann, and Michel Arthur. 2005. "A Novel Peptidoglycan Cross-Linking Enzyme for a β -Lactam-Resistant Transpeptidation Pathway." *Journal of Biological Chemistry* 280(46):38146–52.
- Mainardi, Jean Luc, Raymond Legrand, Michel Arthur, Bernard Schoot, Jean Van Heijenoort, and Laurent

- Gutmann. 2000. "Novel Mechanism of Beta-Lactam Resistance Due to Bypass of DD-Transpeptidation in *Enterococcus Faecium*." *The Journal of Biological Chemistry* 275(22):16490–96.
- Mainardi, Jean Luc, Véronique Morel, Martine Fourgeaud, Julie Cremler, Didier Blanot, Raymond Legrand, Claude Fréhel, Michel Arthur, Jean Van Heijenoort, and Laurent Gutmann. 2002. "Balance between Two Transpeptidation Mechanisms Determines the Expression of β -Lactam Resistance in *Enterococcus Faecium*." *Journal of Biological Chemistry* 277(39):35801–7.
- Malinverni, Juliana C., and Thomas J. Silhavy. 2009. "An ABC Transport System That Maintains Lipid Asymmetry in the Gram-Negative Outer Membrane." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(19):8009–14.
- Mamou, Gideon, Federico Corona, Ruth Cohen-Khait, Nicholas G. Housden, Vivian Yeung, Dawei Sun, Pooja Sridhar, Manuel Pazos, Timothy J. Knowles, Colin Kleanthous, and Waldemar Vollmer. 2022. "Peptidoglycan Maturation Controls Outer Membrane Protein Assembly." *Nature* 2022 606:7916 606(7916):953–59.
- Manat, Guillaume, Sophie Roure, Rodolphe Auger, Ahmed Bouhss, Hélène Barreteau, Dominique Mengin-Lecreulx, and Thierry Touzé. 2014. "Deciphering the Metabolism of Undecaprenyl-Phosphate: The Bacterial Cell-Wall Unit Carrier at the Membrane Frontier." *Microbial Drug Resistance* 20(3):199–214.
- Mandela, Eric, Christopher J. Stubenrauch, David Ryoo, Hyea Hwang, Eli J. Cohen, Von L. Torres, Pankaj Deo, Chaille T. Webb, Cheng Huang, Ralf B. Schittenhelm, Morgan Beeby, J. C. Gumbart, Trevor Lithgow, and Iain D. Hay. 2022. "Adaptation of the Periplasm to Maintain Spatial Constraints Essential for Cell Envelope 2 Processes and Cell Viability." *ELife* 11.
- Marquardt, John L., Deborah A. Siegele, Roberto Kolter, Christopher T. Walsh, K. Trach, J. W. Chapman, P. Piggot, D. LeCoq, J. A. Hoch, and J. Bacteriol. 1992. "Cloning and Sequencing of *Escherichia coli* MurZ and Purification of Its Product, a UDP-N-Acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase." *Journal of Bacteriology* 174(17):5748–52.
- Matias, Valério R. F., Ashraf Al-Amoudi, Jacques Dubochet, and Terry J. Beveridge. 2003. "Cryo-Transmission Electron Microscopy of Frozen-Hydrated Sections of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of Bacteriology* 185(20):6112–18.
- Matias, Valério R. F., and Terry J. Beveridge. 2005. "Cryo-Electron Microscopy Reveals Native Polymeric Cell Wall Structure in *Bacillus subtilis* 168 and the Existence of a Periplasmic Space." *Molecular Microbiology* 56(1):240–51.
- Matsushashi, M., S. Tamaki, S. J. Curtis, and J. L. Strominger. 1979. "Mutational Evidence for Identity of Penicillin-Binding Protein 5 in *Escherichia coli* with the Major D-Alanine Carboxypeptidase IA Activity." *Journal of Bacteriology* 137(1):644–47.
- Mauri, Marco, and Stefan Klumpp. 2014. "A Model for Sigma Factor Competition in Bacterial Cells" edited by C. V. Rao. *PLoS Computational Biology* 10(10):e1003845.
- McGlynn, Peter, and Robert G. Lloyd. 2000. "Modulation of RNA Polymerase by (p)PpGpp Reveals a RecG-Dependent Mechanism for Replication Fork Progression." *Cell* 101(1):35–45.
- McPherson, Derrell C., and David L. Popham. 2003. "Peptidoglycan Synthesis in the Absence of Class A Penicillin-Binding Proteins in *Bacillus subtilis*." *Journal of Bacteriology* 185(4):1423–31.

- Mechold, Undine, Katarzyna Potrykus, Helen Murphy, Katsuhiko S. Murakami, and Michael Cashel. 2013. "Differential Regulation by PpGpp versus PppGpp in Escherichia Coli." *Nucleic Acids Research* 41(12):6175–89.
- Meeske, Alexander J., Eammon P. Riley, William P. Robins, Tsuyoshi Uehara, John J. Mekalanos, Daniel Kahne, Suzanne Walker, Andrew C. Kruse, Thomas G. Bernhardt, and David Z. Rudner. 2016. "SEDS Proteins Are a Widespread Family of Bacterial Cell Wall Polymerases." *Nature* 537(7622):634–38.
- Mengin-Lecreulx, D., and J. Van Heijenoort. 1994. "Copurification of Glucosamine-1-Phosphate Acetyltransferase and N-Acetylglucosamine-1-Phosphate Uridyltransferase Activities of Escherichia Coli: Characterization of the GlmU Gene Product as a Bifunctional Enzyme Catalyzing Two Subsequent Steps in the Pathway for UDP-N-Acetylglucosamine Synthesis." *Journal of Bacteriology* 176(18):5788–95.
- Mengin-Lecreulx, D., C. Michaud, C. Richaud, D. Blanot, and J. Van Heijenoort. 1988. "Incorporation of LL-Diaminopimelic Acid into Peptidoglycan of Escherichia Coli Mutants Lacking Diaminopimelate Epimerase Encoded by DapF." *Journal of Bacteriology* 170(5):2031–39.
- Mengin-Lecreulx, D., L. Texier, M. Rousseau, and J. Van Heijenoort. 1991. "The MurG Gene of Escherichia Coli Codes for the UDP-N-Acetylglucosamine: N-Acetylmuramyl-(Pentapeptide) Pyrophosphoryl-Undecaprenol N-Acetylglucosamine Transferase Involved in the Membrane Steps of Peptidoglycan Synthesis." *Journal of Bacteriology* 173(15):4625–36.
- Mengin-Lecreulx, Dominique, Jean Van Heijenoort, and James T. Park. 1996. "Identification of the Mpl Gene Encoding UDP-N-Acetylmuramate: L-Alanyl-Gamma-D-Glutamyl-Meso-Diaminopimelate Ligase in Escherichia Coli and Its Role in Recycling of Cell Wall Peptidoglycan." *Journal of Bacteriology* 178(18):5347–52.
- Mengin Lecreulx, Dominique, Jean van Heijenoort, J. E. Walker, N. J. Gay, M. Saraste, and A. N. Eberle. 1993. "Identification of the GlmU Gene Encoding N-Acetylglucosamine-1-Phosphate Uridyltransferase in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 175(19):6150–57.
- Merlie, J. P., and L. I. Pizer. 1973. "Regulation of Phospholipid Synthesis in Escherichia Coli by Guanosine Tetraphosphate." *Journal of Bacteriology* 116(1):355.
- Meroueh, Samy O., Krisztina Z. Bencze, Dusan Heseck, Mijoon Lee, Jed F. Fisher, Timothy L. Stemmler, and Shahriar Mobashery. 2006. "Three-Dimensional Structure of the Bacterial Cell Wall Peptidoglycan." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(12):4404.
- Meyer, Laura, Elsa Germain, and Etienne Maisonneuve. 2021. "Regulation of YtfK by CAMP-CRP Contributes to SpoT-Dependent Accumulation of (p)PpGpp in Response to Carbon Starvation YtfK Responds to Glucose Exhaustion." *Frontiers in Microbiology* 12:3232.
- Michaud, Catherine, Dominique Mengin-Lecreulx, Jean van Heijenoort, and Didier Blanot. 1990. "Over-Production, Purification and Properties of the Uridine-Diphosphate-N-Acetylmuramoyl-L-Alanyl-d-Glutamate: Meso-2,6-Diaminopimelate Ligase from Escherichia Coli." *European Journal of Biochemistry* 194(3):853–61.
- Milon, Pohl, Eugene Tischenko, Jerneja Tomšič, Enrico Caserta, Gert Folkers, Anna La Teana, Marina V. Rodnina, Cynthia L. Pon, Rolf Boelens, and Claudio O. Gualera. 2006. "The Nucleotide-Binding Site of Bacterial Translation Initiation Factor 2 (IF2) as a Metabolic Sensor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(38):13962–67.

- Mohammadi, Tamimount, Vincent Van Dam, Robert Sijbrandi, Thierry Vernet, André Zapun, Ahmed Bouhss, Marlies Diepeveen-De Bruin, Martine Nguyen-Distéche, Ben De Kruijff, and Eefjan Breukink. 2011. "Identification of FtsW as a Transporter of Lipid-Linked Cell Wall Precursors across the Membrane." *The EMBO Journal* 30(8):1425–32.
- Mohammadi, Tamimount, Aneta Karczmarek, Muriel Crouvoisier, Ahmed Bouhss, Dominique Mengin-Lecreux, and Tanneke Den Blaauwen. 2007. "The Essential Peptidoglycan Glycosyltransferase MurG Forms a Complex with Proteins Involved in Lateral Envelope Growth as Well as with Proteins Involved in Cell Division in Escherichia Coli." *Molecular Microbiology* 65(4):1106–21.
- Molodtsov, Vadim, Elena Sineva, Lu Zhang, Xuhui Huang, Michael Cashel, Sarah E. Ades, and Katsuhiko S. Murakami. 2018. "Allosteric Effector PpGpp Potentiates the Inhibition of Transcript Initiation by DksA." *Molecular Cell* 69(5):828-839.e5.
- Morè, Niccolò, Alessandra M. Martorana, Jacob Biboy, Christian Otten, Matthias Winkle, Carlos K. Gurnani Serrano, Alejandro Montón Silva, Lisa Atkinson, Hamish Yau, Eefjan Breukink, Tanneke den Blaauwen, Waldemar Vollmer, and Alessandra Polissi. 2019. "Peptidoglycan Remodeling Enables Escherichia Coli To Survive Severe Outer Membrane Assembly Defect" edited by K. A. Kline. *MBio* 10(1).
- Movilla Miangolarra, A., Sophia Hsin Jung Li, Jean François Joanny, Ned S. Wingreen, and Michele Castellana. 2021. "Steric Interactions and Out-of-Equilibrium Processes Control the Internal Organization of Bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118(43):e2106014118.
- Mueller, Elizabeth A., Alexander J. F. Egan, Eefjan Breukink, Waldemar Vollmer, and Petra Anne Levin. 2019. "Plasticity of Escherichia Coli Cell Wall Metabolism Promotes Fitness and Antibiotic Resistance across Environmental Conditions." *ELife* 8.
- Mullineaux, Conrad W., Anja Nenninger, Nicola Ray, and Colin Robinson. 2006. "Diffusion of Green Fluorescent Protein in Three Cell Environments in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 188(10):3442–48.
- Murdeswar, Maya S., and Dipankar Chatterji. 2012. "MS_RHII-RSD, a Dual-Function RNase HII-(p)PpGpp Synthetase from Mycobacterium Smegmatis." *Journal of Bacteriology* 194(15):4003.
- My, Laetitia, Brian Rekoske, Justin J. Lemke, Julie P. Viala, Richard L. Gourse, and Emmanuelle Bouveret. 2013. "Transcription of the Escherichia Coli Fatty Acid Synthesis Operon FabHDG Is Directly Activated by FadR and Inhibited by PpGpp." *Journal of Bacteriology* 195(16):3784–95.
- Nanamiya, Hideaki, Koji Kasai, Akira Nozawa, Choong Soo Yun, Takakuni Narisawa, Kana Murakami, Yousuke Natori, Fujio Kawamura, and Yuzuru Tozawa. 2008. "Identification and Functional Analysis of Novel (p)PpGpp Synthetase Genes in Bacillus Subtilis." *Molecular Microbiology* 67(2):291–304.
- Nelson, David E., and Kevin D. Young. 2000. "Penicillin Binding Protein 5 Affects Cell Diameter, Contour, and Morphology of Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 182(6):1714–21.
- Nelson, David E., and Kevin D. Young. 2001. "Contributions of PBP 5 and DD-Carboxypeptidase Penicillin Binding Proteins to Maintenance of Cell Shape in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 183(10):3055–64.
- Neuhaus, Francis C., and James Baddiley. 2003. "A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of D-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria." *Microbiology and Molecular*

Biology Reviews : *MMBR* 67(4):686–723.

- Neuhaus, Francis C., and Judy L. Lynch. 1964. "The Enzymatic Synthesis of D-Alanyl-d-Alanine. III. On the Inhibition of d-Alanyl-d-Alanine Synthetase by the Antibiotic d-Cycloserine." *Biochemistry* 3(4):471–80.
- Nikaido, Hiroshi. 2003. "Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4):593–656.
- Novais, Â., C. Rodrigues, R. Branquinho, P. Antunes, F. Grosso, L. Boaventura, G. Ribeiro, and L. Peixe. 2012. "Spread of an OmpK36-Modified ST15 *Klebsiella Pneumoniae* Variant during an Outbreak Involving Multiple Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Species and Clones." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 31(11):3057–63.
- Nudler, Evgeny. 2012. "RNA Polymerase Backtracking in Gene Regulation and Genome Instability." *Cell* 149(7):1438–45.
- o'Daniel, Peter I., Jaroslav Zajicek, Weilie Zhang, Qicun Shi, Jed F. Fisher, and Shahriar Mobashery. 2010. "Elucidation of the Structure of the Membrane Anchor of Penicillin-Binding Protein 5 of *Escherichia Coli*." *Journal of the American Chemical Society* 132(12):4110–18.
- Okamoto, Takeshi, Hironori Yoshiyama, Teruko Nakazawa, In Dal Park, Myung Woong Chang, Hideo Yanai, Kiwamu Okita, and Mutsunori Shirai. 2002. "A Change in PBP1 Is Involved in Amoxicillin Resistance of Clinical Isolates of *Helicobacter Pylori*." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50(6):849–56.
- Ostash, Bohdan, and Suzanne Walker. 2010. "Moenomycin Family Antibiotics: Chemical Synthesis, Biosynthesis, and Biological Activity." *Natural Product Reports* 27(11):1594–1617.
- Ovchinnikov, Sergey, Lisa Kinch, Hahnbeom Park, Yuxing Liao, Jimin Pei, David E. Kim, Hetunandan Kamisetty, Nick V. Grishin, and David Baker. 2015. "Large-Scale Determination of Previously Unsolved Protein Structures Using Evolutionary Information." *ELife* 4(September).
- Pagès, Jean Marie, Chloë E. James, and Mathias Winterhalter. 2008. "The Porin and the Permeating Antibiotic: A Selective Diffusion Barrier in Gram-Negative Bacteria." *Nature Reviews Microbiology* 2008 6:12 6(12):893–903.
- Pando, Jasmine M., Richard F. Pfeltz, Jesus A. Cuaron, Vijayaraj Nagarajan, Mukti N. Mishra, Nathaniel J. Torres, Mohamed O. Elasri, Brian J. Wilkinson, and John E. Gustafson. 2017. "Ethanol-Induced Stress Response of *Staphylococcus Aureus*." *Canadian Journal of Microbiology* 63(9):745–57.
- Papp-Wallace, Krisztina M., Andrea Endimiani, Magdalena A. Taracila, and Robert A. Bonomo. 2011. "Carbapenems: Past, Present, and Future." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(11):4943–60.
- Paradis-Bleau, Catherine, Monica Markovski, Tsuyoshi Uehara, Tania J. Lupoli, Suzanne Walker, Daniel E. Kahne, and Thomas G. Bernhardt. 2010. "Lipoprotein Cofactors Located in the Outer Membrane Activate Bacterial Cell Wall Polymerases." *Cell* 143(7):1110–20.
- Park, J. T. 1993. "Turnover and Recycling of the Murein Sacculus in Oligopeptide Permease-Negative Strains of *Escherichia Coli*: Indirect Evidence for an Alternative Permease System and for a Monolayered Sacculus." *Journal of Bacteriology* 175(1):7–11.

- Park, James T., Debabrata Raychaudhuri, Hongshan Li, Staffan Normark, and Dominique Mengin-Lecreux. 1998. "MppA, a Periplasmic Binding Protein Essential for Import of the Bacterial Cell Wall Peptide L-Alanyl-Gamma-D-Glutamyl-Meso-Diaminopimelate." *Journal of Bacteriology* 180(5):1215–23.
- Park, James T., and Jack L. Strominger. 1957. "Mode of Action of Penicillin." *Science* 125(3238):99–101.
- Parveen, Sadiya, and Manjula Reddy. 2017. "Identification of YfiH (PgeF) as a Factor Contributing to the Maintenance of Bacterial Peptidoglycan Composition." *Molecular Microbiology* 105(5):705–20.
- Paul, Brian J., Melanie M. Barker, Wilma Ross, David A. Schneider, Cathy Webb, John W. Foster, and Richard L. Gourse. 2004. "DksA: A Critical Component of the Transcription Initiation Machinery That Potentiates the Regulation of RRNA Promoters by PpGpp and the Initiating NTP." *Cell* 118(3):311–22.
- Paul, Brian J., Melanie B. Berkmen, and Richard L. Gourse. 2005. "DksA Potentiates Direct Activation of Amino Acid Promoters by PpGpp." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(22):7823–28.
- Pazos, Manuel, Katharina Peters, Adrien Boes, Yalda Safaei, Calem Kenward, Nathanael A. Caveney, Cedric Laguri, Eefjan Breukink, Natalie C. J. Strynadka, Jean Pierre Simorre, Mohammed Terrak, and Waldemar Vollmer. 2020. "SPOR Proteins Are Required for Functionality of Class A Penicillin-Binding Proteins in Escherichia Coli." *MBio* 11(6):1–16.
- Pazos, Manuel, Katharina Peters, and Waldemar Vollmer. 2017. "Robust Peptidoglycan Growth by Dynamic and Variable Multi-Protein Complexes." *Current Opinion in Microbiology* 36:55–61.
- Peltier, Johann, Pascal Courtin, Imane El Meouche, Ludovic Lemée, Marie Pierre Chapot-Chartier, and Jean Louis Pons. 2011. "Clostridium Difficile Has an Original Peptidoglycan Structure with a High Level of N-Acetylglucosamine Deacetylation and Mainly 3-3 Cross-Links." *The Journal of Biological Chemistry* 286(33):29053–62.
- Perlstein, Deborah L., Yi Zhang, Tsung Shing Wang, Daniel E. Kahne, and Suzanne Walker. 2007. "The Direction of Glycan Chain Elongation by Peptidoglycan Glycosyltransferases." *Journal of the American Chemical Society* 129(42):12674–75.
- Peters, Katharina, Suresh Kannan, Vincenzo A. Rao, Jacob Biboy, Daniela Vollmer, Stephen W. Erickson, Richard J. Lewis, Kevin D. Young, and Waldemar Vollmer. 2016. "The Redundancy of Peptidoglycan Carboxypeptidases Ensures Robust Cell Shape Maintenance in Escherichia Coli." *MBio* 7(3).
- Peters, Nick T., Thuy Dinh, and Thomas G. Bernhardt. 2011. "A Fail-Safe Mechanism in the Septal Ring Assembly Pathway Generated by the Sequential Recruitment of Cell Separation Amidases and Their Activators." *Journal of Bacteriology* 193(18):4973–83.
- Pisabarro, A. G., M. A. De Pedro, and D. Vazquez. 1985. "Structural Modifications in the Peptidoglycan of Escherichia Coli Associated with Changes in the State of Growth of the Culture." *Journal of Bacteriology* 161(1):238–42.
- Plé, Coline, Heng Keat Tam, Anais Vieira Da Cruz, Nina Compagne, Juan Carlos Jiménez-Castellanos, Reinke T. Müller, Elizabeth Pradel, Wuen Ee Foong, Giuliano Mallocci, Alexia Ballée, Moritz A. Kirchner, Parisa Moshfegh, Adrien Herledan, Andrea Herrmann, Benoit Deprez, Nicolas Willand, Attilio Vittorio Vargiu, Klaas M. Pos, Marion Flipo, and Ruben C. Hartkoorn. 2022. "Pyridylpiperazine-Based Allosteric Inhibitors of RND-Type Multidrug Efflux Pumps." *Nature*

Communications 2022 13:1 13(1):1–11.

- Podkovyrov, Sergey M., and Timothy J. Larson. 1996. "Identification of Promoter and Stringent Regulation of Transcription of the FabH, FabD and FabG Genes Encoding Fatty Acid Biosynthetic Enzymes of Escherichia Coli." *Nucleic Acids Research* 24(9):1747–52.
- Polakis, S. Efthimios, Ras B. Guchhait, and M. Daniel Lane. 1973. "Stringent Control of Fatty Acid Synthesis in Escherichia Coli: Possible Regulation of Acetyl Coenzyme A Carboxylase by PpGpp." *Journal of Biological Chemistry* 248(22):7957–66.
- Potluri, Lakshmi Prasad, Miguel A. de Pedro, and Kevin D. Young. 2012. "Escherichia Coli Low-Molecular-Weight Penicillin-Binding Proteins Help Orient Septal FtsZ, and Their Absence Leads to Asymmetric Cell Division and Branching." *Molecular Microbiology* 84(2):203–24.
- Potluri, Lakshmi Prasad, Aneta Karczmarek, Jolanda Verheul, Andre Piette, Jean Marc Wilkin, Nadine Werth, Manuel Banzhaf, Waldemar Vollmer, Kevin D. Young, Martine Nguyen-Distèche, and Tanneke Den Blaauwen. 2010. "Septal and Lateral Wall Localization of PBP5, the Major D,D-Carboxypeptidase of Escherichia Coli, Requires Substrate Recognition and Membrane Attachment." *Molecular Microbiology* 77(2):300–323.
- Potrykus, Katarzyna, Daniel Vinella, Helen Murphy, Agnieszka Szalewska-Palasz, Richard D'Ari, and Michael Cashel. 2006. "Antagonistic Regulation of Escherichia Coli Ribosomal RNA RrnB P1 Promoter Activity by GreA and DksA." *Journal of Biological Chemistry* 281(22):15238–48.
- Pratviel-Sosa, Flore, Dominique Mengin-Lecreux, and Jean van Heijenoort. 1991. "Over-Production, Purification and Properties of the Uridine Diphosphate N-Acetylmuramoyl-l-Alanine: D-Glutamate Ligase from Escherichia Coli." *European Journal of Biochemistry* 202(3):1169–76.
- Priyadarshini, Richa, Miguel A. De Pedro, and Kevin D. Young. 2007. "Role of Peptidoglycan Amidases in the Development and Morphology of the Division Septum in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 189(14):5334–47.
- Proshkin, Sergey, A. Rachid Rahmouni, Alexander Mironov, and Evgeny Nudler. 2010. "Cooperation between Translating Ribosomes and RNA Polymerase in Transcription Elongation." *Science* 328(5977):504–8.
- Prossliner, Thomas, Kristoffer Skovbo Winther, Michael Askvad Sørensen, and Kenn Gerdes. 2018. "Ribosome Hibernation." *Annual Review of Genetics* 52:321–48.
- Quintela, José Carlos, Marta Caparrós, and Miguel A. de Pedro. 1995. "Variability of Peptidoglycan Structural Parameters in Gram-Negative Bacteria." *FEMS Microbiology Letters* 125(1):95–100.
- Raetz, Christian R. H., and William Dowhan. 1990. "Biosynthesis and Function of Phospholipids in Escherichia Coli." *Journal of Biological Chemistry*.
- Raetz, Christian R. H., and Chris Whitfield. 2002. "Lipopolysaccharide Endotoxins." *Annual Review of Biochemistry* 71:635.
- Rai, Ashutosh K., and Angela M. Mitchell. 2020. "Enterobacterial Common Antigen: Synthesis and Function of an Enigmatic Molecule." *MBio* 11(4):1–19.
- Ranjit, Dev K., Matthew A. Jorgenson, and Kevin D. Young. 2017. "PBP1B Glycosyltransferase and Transpeptidase Activities Play Different Essential Roles during the De Novo Regeneration of Rod Morphology in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 199(7).

- Rasouly, Aviram, Bibhusita Pani, and Evgeny Nudler. 2017. "A Magic Spot in Genome Maintenance." *Trends in Genetics* 33(1):58–67.
- Reed, Patricia, Helena Veiga, Ana M. Jorge, Mohammed Terrak, and Mariana G. Pinho. 2011. "Monofunctional Transglycosylases Are Not Essential for Staphylococcus Aureus Cell Wall Synthesis." *Journal of Bacteriology* 193(10):2549–56.
- Reiness, G., H. L. Yang, G. Zubay, and M. Cashel. 1975. "Effects of Guanosine Tetrphosphate on Cell-Free Synthesis of Escherichia Coli Ribosomal RNA and Other Gene Products." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(8):2881–85.
- Riber, Leise, and Anders Løbner-Olesen. 2020. "Inhibition of Escherichia Coli Chromosome Replication by Rifampicin Treatment or during the Stringent Response Is Overcome by de Novo DnaA Protein Synthesis." *Molecular Microbiology* 114(6):906–19.
- Richaud, C., W. Higgins, D. Mengin-Lecreulx, and P. Stragier. 1987. "Molecular Cloning, Characterization, and Chromosomal Localization of DapF, the Escherichia Coli Gene for Diaminopimelate Epimerase." *Journal of Bacteriology* 169(4):1454–59.
- Rimal, Binayak, Sibusiso Senzani, Christopher Ealand, Gyanu Lamichhane, Bavesh Kana, and Sung Joon Kim. 2022. "Peptidoglycan Compositional Analysis of Mycobacterium Smegmatis Using High-Resolution LC–MS." *Scientific Reports* 2022 12:1 12(1):1–12.
- Rodnina, Marina V. 2018. "Translation in Prokaryotes." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10(9):a032664.
- Roghianian, Mohammad, Szabolcs Semsey, Anders Løbner-Olesen, and Farshid Jalalvand. 2019. "(P)PpGpp-Mediated Stress Response Induced by Defects in Outer Membrane Biogenesis and ATP Production Promotes Survival in Escherichia Coli." *Scientific Reports* 2019 9:1 9(1):1–11.
- Rohs, Patricia D. A., Jackson Buss, Sue I. Sim, Georgia R. Squyres, Veerasak Srisuknimit, Mandy Smith, Hongbaek Cho, Megan Sjodt, Andrew C. Kruse, Ethan C. Garner, Suzanne Walker, Daniel E. Kahne, and Thomas G. Bernhardt. 2018. "A Central Role for PBP2 in the Activation of Peptidoglycan Polymerization by the Bacterial Cell Elongation Machinery" edited by P. H. Viollier. *PLOS Genetics* 14(10):e1007726.
- Rojas, Ana Maria, Måns Ehrenberg, Siv G. E. Andersson, and C. G. Kurland. 1984. "PpGpp Inhibition of Elongation Factors Tu, G and Ts during Polypeptide Synthesis." *Molecular & General Genetics : MGG* 197(1):36–45.
- Rojas, Enrique R., Gabriel Billings, Pascal D. Odermatt, George K. Auer, Lillian Zhu, Amanda Miguel, Fred Chang, Douglas B. Weibel, Julie A. Theriot, and Kerwyn Casey Huang. 2018. "The Outer Membrane Is an Essential Load-Bearing Element in Gram-Negative Bacteria." *Nature* 2018 559:7715 559(7715):617–21.
- Rojas, Enrique, Julie A. Theriot, and Kerwyn Casey Huang. 2014. "Response of Escherichia Coli Growth Rate to Osmotic Shock." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(21):7807–12.
- Rollauer, Sarah E., Moloud A. Soreshjani, Nicholas Noinaj, and Susan K. Buchanan. 2015. "Outer Membrane Protein Biogenesis in Gram-Negative Bacteria." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370(1679).

- Romeis, Tina, and Joachim-Volker -V Höltje. 1994. "Penicillin-Binding Protein 7/8 of Escherichia Coli Is a DD-Endopeptidase." *European Journal of Biochemistry* 224(2):597–604.
- Ropp, Patricia A., Mei Hu, Melanie Olesky, and Robert A. Nicholas. 2002. "Mutations in PonA, the Gene Encoding Penicillin-Binding Protein 1, and a Novel Locus, PenC, Are Required for High-Level Chromosomally Mediated Penicillin Resistance in Neisseria Gonorrhoeae." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(3):769–77.
- Ross, Wilma, Patricia Sanchez-Vazquez, Albert Y. Chen, Jeong-Hyun Lee, Hector L. Burgos, and Richard L. Gourse. 2016. "PpGpp Binding to a Site at the RNAP-DksA Interface Accounts for Its Dramatic Effects on Transcription Initiation during the Stringent Response." *Molecular Cell* 62(6):811–23.
- Rowen, Lee, and Arthur Kornberg. 1978. "Primase, the DnaG Protein of Escherichia Coli. An Enzyme Which Starts DNA Chains." *The Journal of Biological Chemistry* 253(3):758–64.
- Rubino, Frederick A., Sujeet Kumar, Natividad Ruiz, Suzanne Walker, and Daniel E. Kahne. 2018. "Membrane Potential Is Required for MurJ Function." *Journal of the American Chemical Society* 140(13):4481–84.
- Ruiz, Natividad. 2008. "Bioinformatics Identification of MurJ (MviN) as the Peptidoglycan Lipid II Flippase in Escherichia Coli." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(40):15553–57.
- Sacco, Emmanuelle, Mélanie Cortes, Nathalie Josseaume, Christiane Bouchier, Vincent Dubée, Jean Emmanuel Hugonnet, Jean Luc Mainardi, Louis B. Rice, and Michel Arthur. 2015. "Mutation Landscape of Acquired Cross-Resistance to Glycopeptide and β -Lactam Antibiotics in Enterococcus Faecium." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(9):5306–15.
- Sacco, Emmanuelle, Mélanie Cortes, Nathalie Josseaume, Louis B. Rice, Jean Luc Mainardi, and Michel Arthur. 2014. "Serine/Threonine Protein Phosphatase-Mediated Control of the Peptidoglycan Cross-Linking L,D-Transpeptidase Pathway in Enterococcus Faecium." *MBio* 5(4).
- Sacco, Emmanuelle, Jean Emmanuel Hugonnet, Nathalie Josseaume, Julie Cremniter, Lionel Dubost, Arul Marie, Delphine Patin, Didier Blanot, Louis B. Rice, Jean Luc Mainardi, and Michel Arthur. 2010. "Activation of the L,d-Transpeptidation Peptidoglycan Cross-Linking Pathway by a Metallo-d,d-Carboxypeptidase in Enterococcus Faecium." *Molecular Microbiology* 75(4):874–85.
- Sajish, Mathew, Sissy Kalayil, Sunil Kumar Verma, Vinay Kumar Nandicoori, and Balaji Prakash. 2009. "The Significance of EXDD and RXKD Motif Conservation in Rel Proteins." *The Journal of Biological Chemistry* 284(14):9115.
- Salje, Jeanne, Fusinita van den Ent, Piet de Boer, and Jan Löwe. 2011. "Direct Membrane Binding by Bacterial Actin MreB." *Molecular Cell* 43(3):478–87.
- Samarrai, Walied, David X. Liu, Ann Marie White, Barbara Studamire, Jacob Edelstein, Anita Srivastava, Russell L. Widom, and Rivka Rudner. 2011. "Differential Responses of Bacillus Subtilis RRNA Promoters to Nutritional Stress." *Journal of Bacteriology* 193(3):723.
- Sanchez-Vazquez, Patricia, Colin N. Dewey, Nicole Kitten, Wilma Ross, and Richard L. Gourse. 2019. "Genome-Wide Effects on Escherichia Coli Transcription from PpGpp Binding to Its Two Sites on RNA Polymerase." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(17):8310–19.
- Sande, Caitlin, and Chris Whitfield. 2021. "Capsules and Extracellular Polysaccharides in Escherichia Coli

and Salmonella." *EcoSal Plus* 9(2).

- Sanders, Akeisha N., and Martin S. Pavelka. 2013. "Phenotypic Analysis of Escherichia Coli Mutants Lacking L,D-Transpeptidases." *Microbiology (Reading, England)* 159(Pt 9):1842–52.
- Sarubbi, Edoardo, Kenneth E. Rudd, and Michael Cashel. 1988. "Basal PpGpp Level Adjustment Shown by New SpoT Mutants Affect Steady State Growth Rates and RrnA Ribosomal Promoter Regulation in Escherichia Coli." *Molecular & General Genetics : MGG* 213(2–3):214–22.
- Sassine, Jad, Manuel Pazos, Eefjan Breukink, and Waldemar Vollmer. 2021. "Lytic Transglycosylase MltG Cleaves in Nascent Peptidoglycan and Produces Short Glycan Strands." *Cell Surface (Amsterdam, Netherlands)* 7.
- Sauvage, Eric, Adeline Derouaux, Claudine Fraipont, Marine Joris, Raphaël Herman, Mathieu Rocaboy, Marie Schloesser, Jacques Dumas, Frédéric Kerff, Martine Nguyen-Disteche, and Paulette Charlier. 2014. "Crystal Structure of Penicillin-Binding Protein 3 (PBP3) from Escherichia Coli." *PLoS ONE* 9(5):98042.
- Sauvage, Eric, Frédéric Kerff, Mohammed Terrak, Juan A. Ayala, and Paulette Charlier. 2008. "The Penicillin-Binding Proteins: Structure and Role in Peptidoglycan Biosynthesis." *FEMS Microbiology Reviews* 32(2):234–58.
- Sauvage, Eric, and Mohammed Terrak. 2016. "Glycosyltransferases and Transpeptidases/Penicillin-Binding Proteins: Valuable Targets for New Antibacterials." *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 5(1).
- Scheurwater, Edie M., and Anthony J. Clarke. 2008. "The C-Terminal Domain of Escherichia Coli YfhD Functions as a Lytic Transglycosylase." *The Journal of Biological Chemistry* 283(13):8363–73.
- Schiffer, Guido, and Joachim Volker Höltje. 1999. "Cloning and Characterization of PBP 1C, a Third Member of the Multimodular Class A Penicillin-Binding Proteins of Escherichia Coli." *The Journal of Biological Chemistry* 274(45):32031–39.
- Schleifer, K. H., and O. Kandler. 1972. "Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and Their Taxonomic Implications." *Bacteriological Reviews* 36(4):407.
- Schoonmaker, Maia K., William R. Bishai, and Gyanu Lamichhanea. 2014. "Nonclassical Transpeptidases of Mycobacterium Tuberculosis Alter Cell Size, Morphology, the Cytosolic Matrix, Protein Localization, Virulence, and Resistance to β -Lactams." *Journal of Bacteriology* 196(7):1394–1402.
- Schreiber, Gideon, Eliora Z. Ron, and Gad Glaser. 1995. "PpGpp-Mediated Regulation of DNA Replication and Cell Division in Escherichia Coli." *Current Microbiology* 30(1):27–32.
- Schwarz, Uli, Anneleen Asmus, and Hermann Frank. 1969. "Autolytic Enzymes and Cell Division of Escherichia Coli." *Journal of Molecular Biology* 41(3):419–29.
- Selby, Christopher P., and Aziz Sancar. 1993. "Molecular Mechanism of Transcription-Repair Coupling." *Science* 260(5104):53–58.
- Serio, Alisa W., Tiffany Keepers, Logan Andrews, and Kevin M. Krause. 2018. "Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation." *EcoSal Plus* 8(1).
- Seyfzadeh, Manouchehr, John Keener, and Masayasu Nomura. 1993. "SpoT-Dependent Accumulation of Guanosine Tetraphosphate in Response to Fatty Acid Starvation in Escherichia Coli." *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(23):11004–8.
- Shaku, Moagi Tube, and Bavesh Davandra Kana. 2018. “Breaking down Walls.” *ELife* 7.
- Sham, Lok To, Emily K. Butler, Matthew D. Lebar, Daniel Kahne, Thomas G. Bernhardt, and Natividad Ruiz. 2014. “Bacterial Cell Wall. MurJ Is the Flippase of Lipid-Linked Precursors for Peptidoglycan Biogenesis.” *Science* 345(6193):220–22.
- Sharma, Umender K., and Dipankar Chatterji. 2010. “Transcriptional Switching in Escherichia Coli during Stress and Starvation by Modulation of Sigma Activity.” *FEMS Microbiology Reviews* 34(5):646–57.
- Shin, Jung Ho, Alan G. Sulpizio, Aaron Kelley, Laura Alvarez, Shannon G. Murphy, Lixin Fan, Felipe Cava, Yuxin Mao, Mark A. Saper, and Tobias Dörr. 2020. “Structural Basis of Peptidoglycan Endopeptidase Regulation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(21):11692–702.
- Shukla, Rhythm, João Medeiros-Silva, Anish Parmar, Bram J. A. Vermeulen, Sanjit Das, Alessandra Lucini Paioni, Shehrazade Jekhmane, Joseph Lorent, Alexandre M. J. J. Bonvin, Marc Baldus, Moreno Lelli, Edwin J. A. Veldhuizen, Eefjan Breukink, Ishwar Singh, and Markus Weingarh. 2020. “Mode of Action of Teixobactins in Cellular Membranes.” *Nature Communications* 2020 11:1 11(1):1–10.
- Shyp, Viktoriya, Stoyan Tankov, Andrey Ermakov, Pavel Kudrin, Brian P. English, Mäns Ehrenberg, Tanel Tenson, Johan Elf, and Vasili Haurlyuk. 2012. “Positive Allosteric Feedback Regulation of the Stringent Response Enzyme RelA by Its Product.” *EMBO Reports* 13(9):835–39.
- Silhavy, Thomas J., Daniel Kahne, and Suzanne Walker. 2010. “The Bacterial Cell Envelope.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(5).
- Silva, Alejandro Montón, Christian Otten, Jacob Biboy, Eefjan Breukink, Michael Van Nieuwenhze, Waldemar Vollmer, and Tanneke den Blaauwen. 2018. “The Fluorescent D-Amino Acid NADA as a Tool to Study the Conditional Activity of Transpeptidases in Escherichia Coli.” *Frontiers in Microbiology* 9(SEP).
- Singh, Santosh Kumar, Sadiya Parveen, L. SaiSree, and Manjula Reddy. 2015. “Regulated Proteolysis of a Cross-Link-Specific Peptidoglycan Hydrolase Contributes to Bacterial Morphogenesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(35):10956–61.
- Singh, Santosh Kumar, L. SaiSree, Ravi N. Amrutha, and Manjula Reddy. 2012. “Three Redundant Murein Endopeptidases Catalyse an Essential Cleavage Step in Peptidoglycan Synthesis of Escherichia Coli K12.” *Molecular Microbiology* 86(5):1036–51.
- Sinha, Anurag Kumar, Kristoffer Skovbo Winther, Mohammad Roghanian, and Kenn Gerdes. 2019. “Fatty Acid Starvation Activates RelA by Depleting Lysine Precursor Pyruvate.” *Molecular Microbiology* 112(4):1339–49.
- Sjodt, Megan, Kelly Brock, Genevieve Dobihal, Patricia D. A. Rohs, Anna G. Green, Thomas A. Hopf, Alexander J. Meeske, Veerasak Srisuknimit, Daniel Kahne, Suzanne Walker, Debora S. Marks, Thomas G. Bernhardt, David Z. Rudner, and Andrew C. Kruse. 2018. “Structure of the Peptidoglycan Polymerase RodA Resolved by Evolutionary Coupling Analysis.” *Nature* 556(7699):118–21.
- Sjodt, Megan, Patricia D. A. Rohs, Morgan S. A. Gilman, Sarah C. Erlandson, Sanduo Zheng, Anna G. Green, Kelly P. Brock, Atsushi Taguchi, Daniel Kahne, Suzanne Walker, Debora S. Marks, David Z. Rudner, Thomas G. Bernhardt, and Andrew C. Kruse. 2020. “Structural Coordination of

- Polymerization and Crosslinking by a SEDS–BPBP Peptidoglycan Synthase Complex.” *Nature Microbiology* 1–8.
- Skerker, Jeffrey M., and Michael T. Laub. 2004. “Cell-Cycle Progression and the Generation of Asymmetry in *Caulobacter Crescentus*.” *Nature Reviews Microbiology* 2004 2:4 2(4):325–37.
- Sonenshein, Abraham L. 2005. “CodY, a Global Regulator of Stationary Phase and Virulence in Gram-Positive Bacteria.” *Current Opinion in Microbiology* 8(2):203–7.
- Spira, B., N. Silberstein, and E. Yagil. 1995. “Guanosine 3’,5’-Bispyrophosphate (PpGpp) Synthesis in Cells of *Escherichia Coli* Starved for Pi.” *Journal of Bacteriology* 177(14):4053–58.
- Spratt, B. G. 1975. “Distinct Penicillin Binding Proteins Involved in the Division, Elongation, and Shape of *Escherichia Coli* K12.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72(8):2999–3003.
- Spratt, B. G., and J. L. Strominger. 1976. “Identification of the Major Penicillin-Binding Proteins of *Escherichia Coli* as D-Alanine Carboxypeptidase IA.” *Journal of Bacteriology* 127(1):660–63.
- Stankeviciute, Gabriele, Amanda V. Miguel, Atanas Radkov, Seemay Chou, Kerwyn Casey Huang, and Eric A. Klein. 2019. “Differential Modes of Crosslinking Establish Spatially Distinct Regions of Peptidoglycan in *Caulobacter Crescentus*.” *Molecular Microbiology* 111(4):995–1008.
- Stein, J. P., and K. E. Bloch. 1976. “Inhibition of *E. Coli* Beta-Hydroxydecanoyl Thioester Dehydrase by PpGpp.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 73(4):881–84.
- Steinchen, Wieland, Jan S. Schuhmacher, Florian Altegoer, Christopher D. Fage, Vasundara Srinivasan, Uwe Linne, Mohamed A. Marahiel, and Gert Bange. 2015. “Catalytic Mechanism and Allosteric Regulation of an Oligomeric (p)PpGpp Synthetase by an Alarmone.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(43):13348–53.
- Stogios, Peter J., and Alexei Savchenko. 2020. “Molecular Mechanisms of Vancomycin Resistance.” *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 29(3):654–69.
- Stone, K. J., and J. L. Strominger. 1971. “Mechanism of Action of Bacitracin: Complexation with Metal Ion and C55-Isoprenyl Pyrophosphate.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68(12):3223.
- Straume, Daniel, Katarzyna Wiaroslawa Piechowiak, Morten Kjos, and Leiv Sigve Håvarstein. 2021. “Class A PBPs: It Is Time to Rethink Traditional Paradigms.” *Molecular Microbiology* 116(1):41–52.
- Su, Ming Yuan, Nilanjan Som, Chia Yun Wu, Shih Chieh Su, Yi Ting Kuo, Lu Chu Ke, Meng Ru Ho, Shiou Ru Tzeng, Ching Hao Teng, Dominique Mengin-Lecreux, Manjula Reddy, and Chung I. Chang. 2017. “Structural Basis of Adaptor-Mediated Protein Degradation by the Tail-Specific PDZ-Protease Prc.” *Nature Communications* 8(1).
- Suginaka, Hidekazu, Peter M. Blumberg, and Jack L. Strominger. 1972. “Multiple Penicillin-Binding Components in *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Cereus*, *Staphylococcus Aureus*, and *Escherichia Coli*.” *Journal of Biological Chemistry* 247(17):5279–88.
- Sun, Jiawei, Steven T. Rutherford, Thomas J. Silhavy, and Kerwyn Casey Huang. 2021. “Physical Properties of the Bacterial Outer Membrane.” *Nature Reviews Microbiology* 2021 20:4 20(4):236–48.
- Sung, Ming Ta, Yen Ting Lai, Chia Ying Huang, Lien Yang Chou, Hao Wei Shih, Wei Chieh Cheng, Chi Huey Wong, and Che Ma. 2009. “Crystal Structure of the Membrane-Bound Bifunctional Transglycosylase

- PBP1b from Escherichia Coli." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(22):8824–29.
- Sutterlin, Laetitia, Zainab Edo, Jean Emmanuel Hugonnet, Jean Luc Mainardi, and Michel Arthura. 2018. "Peptidoglycan Cross-Linking Activity of L,d-Transpeptidases from Clostridium Difficile and Inactivation of These Enzymes by β -Lactams." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(1).
- Sy, J. 1977. "In Vitro Degradation of Guanosine 5'-Diphosphate, 3'-Diphosphate." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12):5529.
- Taguchi, Atsushi, Michael A. Welsh, Lindsey S. Marmont, Wonsik Lee, Megan Sjodt, Andrew C. Kruse, Daniel Kahne, Thomas G. Bernhardt, and Suzanne Walker. 2019. "FtsW Is a Peptidoglycan Polymerase That Is Functional Only in Complex with Its Cognate Penicillin-Binding Protein." *Nature Microbiology* 4(4):587–94.
- Takahashi, Kosaku, Koji Kasai, and Kozo Ochi. 2004. "Identification of the Bacterial Alarmone Guanosine 5'-Diphosphate 3'-Diphosphate (PpGpp) in Plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(12):4320–24.
- Tängdén, Thomas, Marlen Adler, Otto Cars, Linus Sandegren, and Elisabeth Löwdin. 2013. "Frequent Emergence of Porin-Deficient Subpopulations with Reduced Carbapenem Susceptibility in ESBL-Producing Escherichia Coli during Exposure to Ertapenem in an in Vitro Pharmacokinetic Model." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68(6):1319–26.
- Van Teeffelen, Sven, Siyuan Wang, Leon Furchtgott, Kerwyn Casey Huang, Ned S. Wingreen, Joshua W. Shaevitz, and Zemer Gitai. 2011. "The Bacterial Actin MreB Rotates, and Rotation Depends on Cell-Wall Assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(38):15822–27.
- Templin, Markus F., David H. Edwards, and Joachim-Volker Höltje. 1992. "A Murein Hydrolase Is the Specific Target of Bulgecin in Escherichia Coli." *Journal of Biological Chemistry* 267(28):20039–43.
- Templin, Markus F., Astrid Ursinus, and Joachim Volker Höltje. 1999. "A Defect in Cell Wall Recycling Triggers Autolysis during the Stationary Growth Phase of Escherichia Coli." *The EMBO Journal* 18(15):4108–17.
- Terrak, Mohammed, Tushar K. Ghosh, Jean Van Heijenoort, Jozef Van Beeumen, Maxime Lampilas, Jozsef Aszodi, Juan A. Ayala, Jean Marie Ghuysen, and Martine Nguyen-Distèche. 1999. "The Catalytic, Glycosyl Transferase and Acyl Transferase Modules of the Cell Wall Peptidoglycan-Polymerizing Penicillin-Binding Protein 1b of Escherichia Coli." *Molecular Microbiology* 34(2):350–64.
- Thulin, Elisabeth, Martin Sundqvist, and Dan I. Andersson. 2015. "Amdinocillin (Mecillinam) Resistance Mutations in Clinical Isolates and Laboratory-Selected Mutants of Escherichia Coli." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(3):1718–27.
- Tipper, D. J., and J. L. Strominger. 1965. "Mechanism of Action of Penicillins: A Proposal Based on Their Structural Similarity to Acyl-D-Alanyl-D-Alanine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54(4):1133.
- Tomasz, A. 1979. "The Mechanism of the Irreversible Antimicrobial Effects of Penicillins: How the Beta-Lactam Antibiotics Kill and Lyse Bacteria." *Annual Review of Microbiology* 33:113–37.
- Tomasz, A., and S. Waks. 1975. "Mechanism of Action of Penicillin: Triggering of the Pneumococcal

- Autolytic Enzyme by Inhibitors of Cell Wall Synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(10):4162–66.
- Tooke, Catherine L., Philip Hinchliffe, Eilis C. Bragginton, Charlotte K. Colenso, Viivi H. A. Hirvonen, Yuiko Takebayashi, and James Spencer. 2019. "β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century." *Journal of Molecular Biology* 431(18):3472.
- Trautinger, Brigitte W., Razieh P. Jaktaji, Ekaterina Rusakova, and Robert G. Lloyd. 2005. "RNA Polymerase Modulators and DNA Repair Activities Resolve Conflicts between DNA Replication and Transcription." *Molecular Cell* 19(2):247–58.
- Trautinger, Brigitte W., and Robert G. Lloyd. 2002. "Modulation of DNA Repair by Mutations Flanking the DNA Channel through RNA Polymerase." *The EMBO Journal* 21(24):6944–53.
- Traxler, Matthew F., Sean M. Summers, Huyen Tran Nguyen, Vineetha M. Zacharia, G. Aaron Hightower, Joel T. Smith, and Tyrrell Conway. 2008. "The Global, PpGpp-Mediated Stringent Response to Amino Acid Starvation in Escherichia Coli." *Molecular Microbiology* 68(5):1128–48.
- Triboulet, Sébastien, Catherine M. Bougault, Cédric Laguri, Jean Emmanuel Hugonnet, Michel Arthur, and Jean Pierre Simorre. 2015. "Acyl Acceptor Recognition by Enterococcus Faecium L,D-Transpeptidase Ldtfm." *Molecular Microbiology* 98(1):90–100.
- Triboulet, Sébastien, Vincent Dubée, Lauriane Lecoq, Catherine Bougault, Jean Luc Mainardi, Louis B. Rice, Mélanie Ethève-Quellejeu, Laurent Gutmann, Arul Marie, Lionel Dubost, Jean Emmanuel Hugonnet, Jean Pierre Simorre, and Michel Arthur. 2013. "Kinetic Features of L,D-Transpeptidase Inactivation Critical for β-Lactam Antibacterial Activity." *PLoS ONE* 8(7):e67831.
- Truong, Thao T., Andrea Vettiger, and Thomas G. Bernhardt. 2020. "Cell Division Is Antagonized by the Activity of Peptidoglycan Endopeptidases That Promote Cell Elongation." *Molecular Microbiology* 114(6):966–78.
- Tsang, Mary Jane, Anastasiya A. Yakhnina, and Thomas G. Bernhardt. 2017. "NlpD Links Cell Wall Remodeling and Outer Membrane Invagination during Cytokinesis in Escherichia Coli." *PLOS Genetics* 13(7):e1006888.
- Tuomanen, E., R. Cozens, W. Tosch, O. Zak, and A. Tomasz. 1986. "The Rate of Killing of Escherichia Coli by Beta-Lactam Antibiotics Is Strictly Proportional to the Rate of Bacterial Growth." *Journal of General Microbiology* 132(5):1297–1304.
- Turner, Robert D., Stéphane Mesnage, Jamie K. Hobbs, and Simon J. Foster. 2018. "Molecular Imaging of Glycan Chains Couples Cell-Wall Polysaccharide Architecture to Bacterial Cell Morphology." *Nature Communications* 9(1).
- Turner, Robert D., Waldemar Vollmer, and Simon J. Foster. 2014. "Different Walls for Rods and Balls: The Diversity of Peptidoglycan." *Molecular Microbiology* 91(5):862–74.
- Typas, Athanasios, Manuel Banzhaf, Bart Van Den Berg Van Sapperoea, Jolanda Verheul, Jacob Biboy, Robert J. Nichols, Matylda Zietek, Katrin Beilharz, Kai Kannenberg, Moritz Von Rechenberg, Eefjan Breukink, Tanneke Den Blaauwen, Carol A. Gross, and Waldemar Vollmer. 2010. "Regulation of Peptidoglycan Synthesis by Outer-Membrane Proteins." *Cell* 143(7):1097–1109.
- Typas, Athanasios, Manuel Banzhaf, Carol A. Gross, and Waldemar Vollmer. 2011. "From the Regulation of Peptidoglycan Synthesis to Bacterial Growth and Morphology." *Nature Reviews Microbiology*

2012 10:2 10(2):123–36.

- Ude, Johanna, Vishwachi Tripathi, Julien M. Buyck, Sandra Söderholm, Olivier Cunrath, Joseph Fanous, Beatrice Claudi, Adrian Egli, Christian Schleberger, Sebastian Hiller, and Dirk Bumann. 2021. "Outer Membrane Permeability: Antimicrobials and Diverse Nutrients Bypass Porins in *Pseudomonas Aeruginosa*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118(31):e2107644118.
- Uehara, Tsuyoshi, and James T. Park. 2007. "An Anhydro-N-Acetylmuramyl-L-Alanine Amidase with Broad Specificity Tethered to the Outer Membrane of *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 189(15):5634–41.
- Uehara, Tsuyoshi, Katherine R. Parzych, Thuy Dinh, and Thomas G. Bernhardt. 2010. "Daughter Cell Separation Is Controlled by Cytokinetic Ring-Activated Cell Wall Hydrolysis." *The EMBO Journal* 29(8):1412–22.
- Vadia, Stephen, Jessica L. Tse, Rafael Lucena, Zhizhou Yang, Douglas R. Kellogg, Jue D. Wang, and Petra Anne Levin. 2017. "Fatty Acid Availability Sets Cell Envelope Capacity and Dictates Microbial Cell Size." *Current Biology : CB* 27(12):1757-1767.e5.
- Vargiu, Attilio V., and Hiroshi Nikaido. 2012. "Multidrug Binding Properties of the AcrB Efflux Pump Characterized by Molecular Dynamics Simulations." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(50):20637–42.
- Vega, Daniel, and Juan A. Ayala. 2006. "The DD-Carboxypeptidase Activity Encoded by Pbp4B Is Not Essential for the Cell Growth of *Escherichia Coli*." *Archives of Microbiology* 185(1):23–27.
- Verheul, Jolanda ID, Adam Lodge, Hamish C. L Yau ID, Xiaolong ID Liu, Gabriela BoelterID, Xinwei LiuID, Alexandra S. SolovyovaID, Athanasios TypasID, Manuel BanzhafID, Waldemar VollmerID, and Tanneke den BlaauwenID. 2022. "Early Midcell Localization of *Escherichia Coli* PBP4 Supports the Function of Peptidoglycan Amidases." *PLOS Genetics* 18(5):e1010222.
- Verwer, R. W. H., N. Nanninga, W. Keck, and U. Schwarz. 1978. "Arrangement of Glycan Chains in the Sacculus of *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 136(2):723–29.
- Vigouroux, Antoine, Baptiste Cordier, Andrey Aristov, Laura Alvarez, Gizem Özbaykal, Thibault Chaze, Enno Rainer Oldewurtel, Mariette Matondo, Felipe Cava, David Bikard, and Sven van Teeffelen. 2020. "Class-A Penicillin Binding Proteins Do Not Contribute to Cell Shape but Repair Cell-Wall Defects." *ELife* 9.
- Vinella, D., R. D'Ari, and P. Bouloc. 1992. "Penicillin Binding Protein 2 Is Dispensable in *Escherichia Coli* When PpGpp Synthesis Is Induced." *The EMBO Journal* 11(4):1493–1501.
- Vinella, Daniel, Christian Albrecht, Michael Cashel, and Richard D'Ari. 2005. "Iron Limitation Induces SpoT-Dependent Accumulation of PpGpp in *Escherichia Coli*." *Molecular Microbiology* 56(4):958–70.
- Vollmer, Waldemar. 2012. "Bacterial Growth Does Require Peptidoglycan Hydrolases." *Molecular Microbiology* 86(5):1031–35.
- Vollmer, Waldemar, Didier Blanot, and Miguel A. De Pedro. 2008. "Peptidoglycan Structure and Architecture." *FEMS Microbiology Reviews* 32(2):149–67.
- Vollmer, Waldemar, and Joachim Volker Höltje. 2004. "The Architecture of the Murein (Peptidoglycan) in

- Gram-Negative Bacteria: Vertical Scaffold or Horizontal Layer(S)?" *Journal of Bacteriology* 186(18):5978–87.
- Wahl, Astrid, Laetitia My, Romain Dumoulin, James N. Sturgis, and Emmanuelle Bouveret. 2011. "Antagonistic Regulation of DgkA and PlsB Genes of Phospholipid Synthesis by Multiple Stress Responses in Escherichia Coli." *Molecular Microbiology* 80(5):1260–75.
- Wang, Boyuan, Peng Dai, David Ding, Amanda Del Rosario, Robert A. Grant, Bradley L. Pentelute, and Michael T. Laub. 2019. "Affinity-Based Capture and Identification of Protein Effectors of the Growth Regulator PpGpp." *Nature Chemical Biology* 15(2):141–50.
- Wang, Boyuan, Robert A. Grant, and Michael T. Laub. 2020. "PpGpp Coordinates Nucleotide and Amino-Acid Synthesis in E. Coli During Starvation." *Molecular Cell* 80(1):29-42.e10.
- Wang, Jue D., Glenn M. Sanders, and Alan D. Grossman. 2007. "Nutritional Control of Elongation of DNA Replication by (p)PpGpp." *Cell* 128(5):865–75.
- Weaver, Anna, Laura Alvarez, Kelly Rosch, Asraa Ahmed, Garrett Wang, Michael Van Nieuwenhze, Felipe Cava, and Tobias Dörr. 2022. "Lytic Transglycosylases Mitigate Periplasmic Crowding by Degrading Soluble Cell Wall Turnover Products." *ELife* 11.
- Weber, Harald, Tino Polen, Johanna Heuveling, Volker F. Wendisch, and Regine Hengge. 2005. "Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in Escherichia Coli: Σ S-Dependent Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity." *Journal of Bacteriology* 187(5):1591–1603.
- Welsh, Michael A., Kaitlin Schaefer, Atsushi Taguchi, Daniel Kahne, and Suzanne Walker. 2019. "Direction of Chain Growth and Substrate Preferences of Shape, Elongation, Division, and Sporulation-Family Peptidoglycan Glycosyltransferases." *Journal of the American Chemical Society* 141(33):12994–97.
- Weppners, William A., and Francis C. Neuhaus. 1978. "Biosynthesis of Peptidoglycan. Definition of the Microenvironment of Undecaprenyl Diphosphate-N-Acetylmuramyl-(5-Dimethylaminonaphthalene-1-Sulfonyl) Pentapeptide by Fluorescence Spectroscopy." *Journal of Biological Chemistry* 253(2):472–78.
- Wexselblatt, Ezequiel, Ilana Kaspy, Gad Glaser, Joshua Katzhendler, and Eylon Yavin. 2013. "Design, Synthesis and Structure-Activity Relationship of Novel Relacin Analogs as Inhibitors of Rel Proteins." *European Journal of Medicinal Chemistry* 70:497–504.
- Wexselblatt, Ezequiel, Yaara Oppenheimer-Shaanan, Ilana Kaspy, Nir London, Ora Schueler-Furman, Eylon Yavin, Gad Glaser, Joshua Katzhendler, and Sigal Ben-Yehuda. 2012. "Relacin, a Novel Antibacterial Agent Targeting the Stringent Response." *PLOS Pathogens* 8(9):e1002925.
- Wijsman, H. J. W. 1972. "The Characterization of an Alanine Racemase Mutant of Escherichia Coli." *Genetics Research* 20(3):269–77.
- Wild, J., J. Hennig, M. Lobočka, W. Walczak, and T. Kłopotowski. 1985. "Identification of the DadX Gene Coding for the Predominant Isozyme of Alanine Racemase in Escherichia Coli K12." *Molecular and General Genetics MGG* 198:2 198(2):315–22.
- Winkle, Matthias, Víctor M. Hernández-Rocamora, Karthik Pallela, Emily C. A. Goodall, Alessandra M. Martorana, Joe Gray, Ian R. Henderson, Alessandra Polissi, and Waldemar Vollmer. 2021. "Dpaa Detaches Braun's Lipoprotein from Peptidoglycan." *MBio* 12(3).
- Wise, E. M., and J. T. Park. 1965. "Penicillin: Its Basic Site of Action as an Inhibitor of a Peptide Cross-

- Linking Reaction in Cell Wall Muropeptide Synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54(1):75.
- Wissel, Mark C., and David S. Weiss. 2004. "Genetic Analysis of the Cell Division Protein FtsI (PBP3): Amino Acid Substitutions That Impair Septal Localization of FtsI and Recruitment of FtsN." *Journal of Bacteriology* 186(2):490–502.
- Xiao, Hua, Miklos Kalman, Kenji Ikehara, Sharon Zemel, Gad Glaser, and Michael Cashel. 1991. "Residual Guanosine 3',5'-Bispyrophosphate Synthetic Activity of RelA Null Mutants Can Be Eliminated by SpoT Null Mutations." *The Journal of Biological Chemistry* 226(9):5980–90.
- Yang, Da, Jaana Männik, Scott T. Retterer, and Jaan Männik. 2020. "The Effects of Polydisperse Crowders on the Compaction of the Escherichia Coli Nucleoid." *Molecular Microbiology* 113(5):1022–37.
- Yocum, R. R., D. J. Waxman, J. R. Rasmussen, and J. L. Strominger. 1979. "Mechanism of Penicillin Action: Penicillin and Substrate Bind Covalently to the Same Active Site Serine in Two Bacterial D-Alanine Carboxypeptidases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(6):2730.
- Yousif, S. Y., J. K. Broome-Smith, and B. G. Spratt. 1985. "Lysis of Escherichia Coli by Beta-Lactam Antibiotics: Deletion Analysis of the Role of Penicillin-Binding Proteins 1A and 1B." *Journal of General Microbiology* 131(10):2839–47.
- Yunck, Rachel, Hongbaek Cho, and Thomas G. Bernhardt. 2016. "Identification of MltG as a Potential Terminase for Peptidoglycan Polymerization in Bacteria." *Molecular Microbiology* 99(4):700–718.
- Zapun, André, Carlos Contreras-Martel, and Thierry Vernet. 2008. "Penicillin-Binding Proteins and Beta-Lactam Resistance." *FEMS Microbiology Reviews* 32(2):361–85.
- Zawadzke, Laura E., Timothy D. H. Bugg, and Christopher T. Walsh. 1991. "Existence of Two D-Alanine:D-Alanine Ligases in Escherichia Coli: Cloning and Sequencing of the DdlA Gene and Purification and Characterization of the DdlA and DdlB Enzymes." *Biochemistry* 30(6):1673–82.
- Zhang, Yong Everett, René Lysdal Bærentsen, Tobias Fuhrer, Uwe Sauer, Kenn Gerdes, and Ditlev Egeskov Brodersen. 2019. "(P)PpGpp Regulates a Bacterial Nucleosidase by an Allosteric Two-Domain Switch." *Molecular Cell* 74(6):1239-1249.e4.
- Zhang, Yong, Eva Zborníková, Dominik Rejman, and Kenn Gerdes. 2018. "Novel (p)PpGpp Binding and Metabolizing Proteins of Escherichia Coli." *MBio* 9(2).
- Zuber, Benoît, Marisa Haenni, Tânia Ribeiro, Kathrin Minnig, Fátima Lopes, Philippe Moreillon, and Jacques Dubochet. 2006. "Granular Layer in the Periplasmic Space of Gram-Positive Bacteria and Fine Structures of Enterococcus Gallinarum and Streptococcus Gordonii Septa Revealed by Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections." *Journal of Bacteriology* 188(18):6652–60.

Résistance aux β -lactamines médiée par la L,D-transpeptidase YcbB chez *Escherichia coli*.

Le peptidoglycane est une macromolécule qui entoure complètement les bactéries et les protège de la pression osmotique exercée par le cytoplasme. Les β -lactamines, les antibiotiques les plus couramment utilisés en thérapeutique, inhibent les D,D-transpeptidases appartenant à la famille des protéines de liaison à la pénicilline (PBP) qui catalysent la dernière étape de réticulation du peptidoglycane. Les L,D-transpeptidases (LDT), qui ne sont pas apparentées aux PBP, confèrent une résistance aux β -lactamines en remplaçant fonctionnellement les PBP et en réticulant le peptidoglycane chez des mutants de *Escherichia coli*. La thèse explore ce mécanisme de résistance aux β -lactamines médiée par la LDT YcbB. Nous avons montré que l'expansion d'un peptidoglycane réticulé par YcbB nécessite l'action d'endopeptidases spécifiques ainsi que l'activité glycosyltransférase de l'élongasome. A l'échelle du génome, nous avons identifié l'ensemble des gènes nécessaires à la résistance aux β -lactamines médiée par la LDT YcbB. Ces gènes sont impliqués non seulement dans le métabolisme du peptidoglycane mais également dans l'homéostasie de l'enveloppe bactérienne et dans la réponse au stress oxydant induit par la fixation des β -lactamines à leurs cibles. De manière inattendue, nous avons montré que la fixation des β -lactamines à leurs cibles perturbe la perméabilité de la membrane externe et engendre une pénétration auto-promue de ces antibiotiques dans le périplasme. En plus de l'action de YcbB dans la synthèse du peptidoglycane, l'activation du mécanisme de résistance nécessite la production de l'alarmone (p)ppGpp. Le rôle essentiel de l'alarmone (p)ppGpp dans ce mécanisme de résistance a été assigné à une réduction de la transcription des ARN ribosomiaux, limitant le stress oxydant déclenché par la synthèse et la dégradation de polymères de peptidoglycane aberrants.

Mots clés : *Escherichia coli* ; Peptidoglycane ; L,D-transpeptidase ; β -lactamine ; (p)ppGpp

β -lactam resistance mediated by the YcbB L,D-transpeptidase in *Escherichia coli*.

Peptidoglycan is a macromolecule that completely surrounds bacteria and protects them from osmotic pressure exerted by the cytoplasm. The β -lactams, the most commonly used antibiotics in therapy, inhibit D,D-transpeptidases belonging to the penicillin-binding protein (PBP) family that catalyze the final cross-linking step of peptidoglycan synthesis. L,D-transpeptidases (LDTs) such as YcbB, which are unrelated to PBPs, confer β -lactam resistance by functionally replacing PBPs and cross-linking the peptidoglycan in *Escherichia coli* mutants. This thesis investigates the YcbB-mediated β -lactam resistance mechanism. We show that the expansion of a YcbB cross-linked peptidoglycan requires the action of specific endopeptidases as well as the glycosyltransferase activity of the elongasome. At the genome scale, we have identified the set of genes required for YcbB-mediated β -lactam resistance. These genes are involved not only in peptidoglycan metabolism but also in bacterial envelope homeostasis and in the response to oxidative stress induced by β -lactam binding to their targets. Unexpectedly, we have shown that the binding of β -lactams to their targets disrupts the permeability of the outer membrane and generates a self-promoting penetration of these antibiotics into the periplasm. In addition to the action of YcbB in peptidoglycan synthesis, activation of the resistance mechanism requires the production of the alarmone (p)ppGpp. The essential role of (p)ppGpp in this resistance mechanism has been assigned to a reduction in ribosomal RNA transcription, limiting the oxidative stress triggered by the synthesis and degradation of aberrant peptidoglycan polymers.

Keywords: *Escherichia coli*; Peptidoglycan; L,D-transpeptidase; β -lactam; (p)ppGpp