



HAL
open science

Adaptation de l'enveloppe bactérienne à la croissance en biofilm

Inès Hugonneau Beaufet

► **To cite this version:**

Inès Hugonneau Beaufet. Adaptation de l'enveloppe bactérienne à la croissance en biofilm. Microbiologie et Parasitologie. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS056 . tel-04536001

HAL Id: tel-04536001

<https://theses.hal.science/tel-04536001>

Submitted on 7 Apr 2024

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

École doctorale 515 « Complexité du Vivant »

Centre de Recherche des Cordeliers, UMRS 1138, Équipe 12

Structures Bactériennes Impliquées dans la Modulation de la Résistance aux Antibiotiques

Adaptation de l'enveloppe bactérienne à la croissance en biofilm

Par **Inès Hugonneau Beaufet**

Thèse de doctorat de Microbiologie

Dirigée par Michel Arthur

Présentée et soutenue publiquement le 31 mars 2023

Devant un jury composé de :

Pr. Alexandra Aubry, PU-PH, Sorbonne Université

Pr. Claire Janoir, PR, Université Paris-Saclay

Dr. Thierry Touzé, DR, Université Paris-Saclay

Dr. Régis Villet, Bioaster

Dr. Michel Arthur, DR, INSERM

Présidente

Rapporteure

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

À Claire Janoir, Thierry Touzé, Régis Villet et Alexandra Aubry, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'évaluer mon travail. Régis, merci pour ton accompagnement et tes précieux conseils tout au long de ces trois années.

À Michel Arthur, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour avoir dirigé cette thèse. J'ai énormément appris grâce à vous, merci pour votre immense aide, et pour tout le temps et la confiance que vous m'avez accordés.

À tous les collaborateurs avec qui j'ai eu la chance de travailler : Jean-Marc Ghigo, Christophe Beloin, Stanislas Thiriet-Rupert, Sylvie Létoffé, Ivo Boneca, Catherine Werts et Arnaud Guttierrez. Nos réunions de travail ont toujours été de très bons moments, merci pour votre bienveillance.

À tous les membres de l'équipe 12, anciens et actuels, avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler pendant ces trois ans. À Jean-Emmanuel Hugonnet, Guennadi Sezonov, Jean-Luc Mainardi, Jean-Philippe Barnier et Filippo Rusconi, pour vos encouragements, votre aide, et tout ce que vous m'avez enseigné durant cette thèse.

À Matthieu Fonvielle, pour ton immense soutien, je suis infiniment reconnaissante d'avoir croisé ta route (on dit chocolatine).

À la prochaine fournée : Yucheng, Constantin, Quentin, Maria et Mathilde, pour avoir été les meilleurs collègues qui soient. Constantin, merci pour toute l'aide que tu m'as apportée, mais aussi pour tes blagues, tes imitations proches de la perfection, ta créativité sans limite et j'en passe (il reste une affiche dans le labo, cherche bien). Quentin, ne cane pas, tu vas t'en sortir comme un chef c'est certain. J'ai hâte de tous vous voir soutenir.

Aux anciens : Nicolas, Léa, Louis, Heiner, Zainab, Henri, Delphine et Lauriane. Henri, aka le sorcier de l'ADN, merci pour ton aide tout au long de ce projet. Bien que tu sois très pédagogue, sache que ce que tu fais relève toujours un peu de la magie à mes yeux. Je vous souhaite tout le meilleur avec Zainab. Heiner, merci pour ton soutien et pour tous ces moments partagés, à essayer de comprendre le sens du verlan et autres absurdités françaises, passe dans le Sud-Ouest quand tu veux Doc².

Delphine, Lauriane, mes deux rayons de soleil. Ne plus vous voir quotidiennement me manque déjà, il va falloir que je prenne des billets pour la Bretagne dans pas trop longtemps moi. Delphine, merci pour tes éclats de voix qui remplissent le labo, ta franchise, ta sensibilité et ton très grand sens de la fête. Tu es une personne extraordinaire avec un cœur gros comme ça. Lauriane, je pourrais écrire des pages pour essayer de tout te dire mais les mots me manqueraient. Merci d'être devenue une véritable amie avec qui je peux tout partager et sur qui je peux tant compter. Tu es incroyablement solide et j'ai eu énormément de chance d'évoluer à tes côtés. À nos nouvelles vies !

À Ludovic Sauguet, merci de m'avoir fait confiance au tout début de mon parcours et de m'avoir donné envie de continuer dans cette voie. À Camille et Clément, mes deux modèles de chercheurs, merci d'être encore là après toutes ces années.

À Mélanie, Pauline, Solenn, Julie et Charlène. I'll tell you what I want, what I really, really want : rien de plus que de pouvoir continuer à vous compter parmi mes personnes préférées pendant encore de nombreuses années. Merci d'être toujours présentes, je suis si fière de grandir avec vous. Note pour Oscar : sois bien attentif, c'est interro surprise après la soutenance.

À Estelle, Marieke, Aliénor et Véronique. De Tivoli à Londres en passant par l'Alsace et Madrid, loin des yeux mais jamais très loin du cœur. Vivement notre prochain tea-time au pays-du-rosbeef-en-folie.

À Louise, ma Loulou. Je ferai volontiers deux heures de train rien que pour venir prendre un café le dimanche matin chez Satiō, ou pour parler longuement autour de la burrata du Petit Martin un mardi soir. En attendant notre maison les pieds dans le sable, merci d'être la personne merveilleuse que tu es. Merci d'avoir toujours été si accueillantes avec Marie, merci pour votre sens de la fête inégalé, vous êtes les meilleures.

À Claire. Mi Amelia, merci pour ton amitié et ton soutien constants depuis toutes ces années. Tu es une force tranquille à qui je suis certaine de toujours pouvoir faire confiance. Merci d'être toi.

À ma famille, pour votre soutien sans faille quelles que soient les épreuves.

À mes parents, qui sont objectivement les meilleurs du monde. Papa, je crois avoir hérité bien des choses de toi, mais je pense en particulier à ta créativité et à ta curiosité insatiable qui te poussent à entreprendre dans des tas de domaines et qui m'inspirent profondément. Tu le sais, Gilno a bercé l'écriture de cette thèse (signé : une fan). Maman, si forte et présente à chaque instant. Merci de m'avoir écoutée, conseillée et surtout comprise tant de fois. Merci de n'avoir jamais douté de moi quand je doute trop, vous êtes ma force et je suis fière d'être votre fille.

À Quitterie, ma sœur préférée et à Charles, mon frère préféré. Vous avancez dans la vie avec une intelligence et une aisance que j'admire tous les jours. Merci d'avoir toujours répondu à l'appel lorsque je ressentais le besoin de quitter mon rôle d'aînée et de devenir votre petite sœur. Des rochers de Carnon aux pavés parisiens, votre présence m'est indispensable à toutes les étapes de ma vie.

À Bonne-Maman, merci de me suivre dans mes aventures avec autant de constance. Vous êtes pour moi une immense source d'inspiration. À Bon-Papa et Mamie, je sais que vous me regardez et j'espère vous rendre fiers.

À Mathilde, Maxime et petite Iris, merci pour votre présence et votre confiance. À tous les cousins, j'ai hâte de vous retrouver pour qu'on rachète enfin nos terres, c'est-à-dire Carnon (tout entier oui).

À Paul, aux premières loges depuis le début et même avant. À ce stade, de simples mots ne suffisent pas. On a rigolé (beaucoup), on a pleuré (un peu), et ce travail c'est aussi le tien. J'ai trouvé en toi le meilleur compagnon de route dont je puisse rêver. Merci d'être ma safe place, l'épaule sur laquelle je peux me reposer, et un million d'autres choses. La vie est douce à tes côtés et j'ai hâte de poursuivre l'aventure avec toi (promis, après j'arrête les thèses).

On m'avait pourtant prévenue à maintes reprises, une thèse c'est dur. Trois ans, c'est très long et en même temps très court. Personne ne comprendra ce que tu fais, ni pourquoi tu le fais. Comme toujours, il a fallu que je vérifie par moi-même... J'ai connu des moments de frustration et de tristesse intenses, et des moments de joie et de fierté tout aussi intenses. À chacun de ces instants, j'ai pu compter sur le soutien d'un bon nombre de personnes et me rendre compte par la même occasion à quel point j'étais entourée. Vous m'avez portée jusqu'ici et rien n'aurait été possible sans vous. Merci pour tout.

Il serait bon de penser longuement
– pour trouver à en dire quelque chose –
à ces longues après-midis perdues de l'enfance
qui ne revinrent jamais telles – et pourquoi ?

On se rappelle encore : peut-être sous la pluie,
mais nous ne savons plus ce que cela veut dire ;
jamais plus la vie ne fut si pleine qu'alors,
de rencontres, de revoirs, d'élans et d'essor,

Car il ne nous arrivait en fait rien d'autre
que ce qui arrive à une chose où à une bête
nous vivions leur vie avec les gestes humains
et nous fûmes remplis d'images jusqu'au bord.

Et nous devînmes solitaires comme un berger
et tant chargés de grands lointains
et comme appelés de loin et effleurés ;
puis lentement comme un fil nouveau et long
nous fûmes introduits en ce collier d'images
où durer maintenant nous rend confus.

Rainer Maria Rilke, *Enfance, Neue Gedichte* (1907)

TABLE DES MATIÈRES

Liste des abréviations	8
Liste des figures	10
Liste des tableaux	11
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	12
I. L'enveloppe bactérienne	13
II. Le peptidoglycane	16
1. Structure et fonctions	16
2. Synthèse des précurseurs	19
a) Étapes cytoplasmiques.....	19
b) Étapes membranaires	20
c) Translocation du lipide II à travers la membrane cytoplasmique.....	21
3. Polymérisation	23
a) Les protéines de liaison à la pénicilline	26
b) Les L,D-transpeptidases	30
4. Turnover et recyclage	41
5. Antibiotiques ciblant la synthèse du peptidoglycane.....	43
III. Les β -lactamines.....	44
1. Découverte	44
2. Mode d'action	45
3. Classification	46
4. Mécanismes de résistance	49
IV. Les biofilms.....	53
1. Historique et importance en clinique.....	53
2. Développement	55
a) Étapes de formation	55
b) Diversité et rôles des composants de la matrice	56
3. Hétérogénéité	59
a) Physico-chimique	59
b) Biologique.....	60

4. Tolérance aux agressions extérieures	60
a) Diffusion réduite des antibiotiques	61
b) Altération du micro-environnement	62
c) Mécanismes génétiques spécifiques	62
d) Bactéries persistantes.....	63
5. Stratégies d'éradication.....	66
a) Pipeline antimicrobien pré-clinique.....	66
b) Mesures préventives	67
c) Traitements curatifs	68
OBJECTIFS.....	74
RÉSULTATS	76
Introduction aux articles.....	77
Article 1.....	79
Article 2.....	123
DISCUSSION	160
1. Étude comparative des LDT produites par différentes espèces.....	161
2. Les multiples facettes de YafK.....	166
3. Exploration du rôle des LDT chez <i>Escherichia coli</i>	167
a) Stimulation de l'immunité innée	167
b) Stabilité de l'enveloppe	168
c) Perspectives	169
RÉFÉRENCES.....	171

Liste des abréviations

A	
AG	Acide Gras
B	
BLSE	β -lactamases à spectre étendu
C	
CMI	Concentration Minimal Inhibitrice
D	
DAP	Acide diaminopimélique
DBO	Diazabicyclooctane
E	
ECA	Enterobacterial common antigens
EPS	Substances polymériques extracellulaires
G	
GlcNAc	<i>N</i> -acétylglucosamine
GTase	Transglycosylase
H	
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
L	
LB	Lysogeny Broth
LDT	L,D-transpeptidase
Lpp	Lipoprotéine de Braun
LPS	Lipopolysaccharides
M	
MBP	Protéine de liaison au maltose
MDP	Muramyl dipeptide (MurNac–L-Ala–D-Glu)
MS	Spectrométrie de masse
MurNAc	Acide <i>N</i> -acétylmuramique
N	
NAG	<i>N</i> -acétylglucosamine
NAM	Acide <i>N</i> -acétylmuramique
NOD	Nucleotide-binding Oligomerisation Domain
O	
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OMV	Outer Membrane Vesicle

P	
PAM	Peptide Antimicrobien
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PG	Peptidoglycane
PGA	β -1,6-poly-N-acetylglucosamine
PLP	Protéines de Liaison à la Pénicilline
(p)ppGpp	Guanosine 5'-[di/tri]phosphate 3'-diphosphate
R	
RNAP	ARN polymérase
RND	Résistance, Nodulation, Division
S	
SEDS	Shape, Elongation, Division, Sporulation
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
T	
TA	Toxine-Antitoxine
TL	Transglycosylase lytique
TLR	Toll-like Receptor
TPase	Transpeptidase
U	
UB2H	UvrB domain 2 homologue
UDP	Uridine-5'-diphosphate
W	
WT	Wild-type

Les acides aminés sont indiqués à l'aide de leur code à trois lettres, précédé d'un identificateur stéréochimique (D/L) si nécessaire.

Liste des figures

Figure 1. Structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif, à Gram positif et des mycobactéries.....	14
Figure 2. Structure du disaccharide-pentapeptide, sous-unité peptidoglycane de base, chez les bactéries à Gram négatif.....	18
Figure 3. Étapes cytoplasmiques de la synthèse du peptidoglycane d'une bactérie à Gram négatif	23
Figure 4. Étapes périplasmiques de la synthèse du peptidoglycane d'une bactérie à Gram négatif.....	26
Figure 5. Structure de la PLP1b de <i>E. coli</i> obtenue par cryo-microscopie électronique	28
Figure 6. Réactions de D,D-transpeptidation et D,D-carboxypeptidation catalysées par les PLP	29
Figure 7. Diversité structurale des LDT.....	33
Figure 8. Structure de l'adduit covalent formé par acylation de YcbB par le mérépénème.....	34
Figure 9. Trois grands types de réactions catalysées par les LDT	40
Figure 10. Structure de la pénicilline G	45
Figure 11. Analogie structurale entre le substrat naturel des PLP et les β -lactamines	46
Figure 12. Mécanismes de résistance aux β -lactamines chez les bactéries à Gram négatif.....	52
Figure 13. Principales infections associées à la formation de biofilms bactériens	54
Figure 14. Étapes de formation et structure d'un biofilm bactérien.....	56
Figure 15. Tolérance des biofilms.....	65
Figure 16. Vue d'ensemble du pipeline antibactérien préclinique au 1 ^{er} mai 2019.....	67
Figure 17. Stratégies thérapeutiques prometteuses pour l'éradication des biofilms.....	72
Figure 18. Environnement des gènes, prédictions de structure et pourcentages d'identité des LDT de <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i>	166

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des PLP de <i>E. coli</i> et correspondance chez <i>P. aeruginosa</i>	30
Tableau 2. Proportion des ponts de type 3→3 et CMI de l'ampicilline chez les mutants de D344S ...	31
Tableau 3. Structure des classes de β -lactamines et d'un représentant de chaque classe	48
Tableau 4. Fonction des substances polymériques extracellulaires présentes dans la matrice des biofilms bactériens.....	58

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'enveloppe bactérienne

Les cellules bactériennes sont délimitées par une enveloppe cellulaire qui sépare et protège leur cytoplasme du milieu environnant. L'enveloppe cellulaire est une structure complexe responsable de la forme et de l'intégrité structurale des cellules bactériennes. C'est aussi une barrière physiologique qui permet le transport sélectif de différents composés, comme l'importation de nutriments (Höltje, 1998).

En 1884, Hans Christian Gram a mis au point une procédure de coloration qui lui a permis de classer la quasi-totalité des bactéries en deux grands groupes. Un groupe de bactéries conserve la coloration de Gram, les bactéries à Gram positif, et l'autre non, les bactéries à Gram-négatif. La coloration de Gram repose sur les différences structurales de l'enveloppe cellulaire entre ces deux groupes de bactéries (Silhavy *et al.*, 2010). Bien que cette coloration éponyme soit encore largement utilisée, il est devenu clair au cours des décennies suivantes que la structure de l'enveloppe cellulaire était trop variable pour rentrer dans une classification dichotomique et que la coloration de Gram seule pouvait souvent conduire à des interprétations erronées de sa composition.

De façon générale, l'enveloppe bactérienne est composée (i) d'une membrane interne (aussi appelée membrane cytoplasmique), qui sépare le cytoplasme du périplasma, (ii) d'un peptidoglycane, et (iii) d'une membrane externe, uniquement présente chez les bactéries à Gram négatif, qui constitue une barrière de perméabilité supplémentaire (Figure 1). De nombreuses bactéries produisent également une couche externe de polysaccharides appelée capsule et parfois essentielle à leur virulence (Wen and Zhang, 2015). Les mycobactéries forment un groupe à part, puisqu'elles ne possèdent pas de membrane externe, mais une importante structure composée de peptidoglycane, d'arabinogalactane et d'acide mycolique qui constitue une barrière de perméabilité externe (Brennan and Nikaido, 1995).

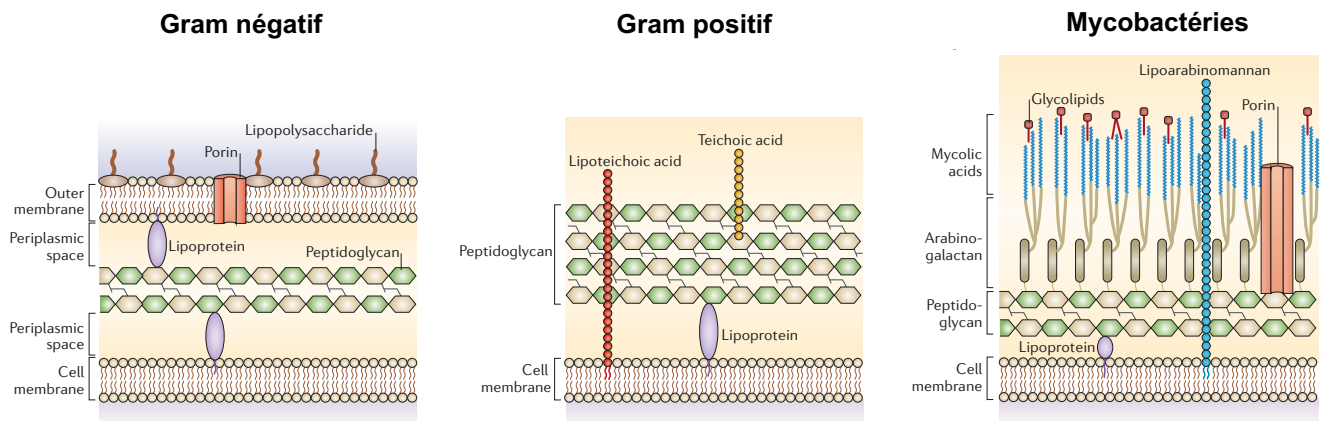


Figure 1. Structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif, à Gram positif et des mycobactéries.

L'enveloppe des bactéries à Gram négatif (à gauche) est constituée d'une fine couche de peptidoglycane dans l'espace périplasmique entre les membranes interne et externe. La membrane externe contient des porines et des lipopolysaccharides. Les bactéries à Gram positif (au milieu) n'ont pas de membrane externe. Leur peptidoglycane est plus épais que celui des bactéries à Gram négatif et sert d'attache aux acides teichoïques de la paroi et à de nombreuses protéines. Les mycobactéries (à droite) possèdent une paroi cellulaire complexe qui contient des glycolipides, des acides mycoliques, de l'arabinogalactane et un peptidoglycane épais.

[Extraite de (Brown *et al.*, 2015)]

Membrane interne

La membrane interne, ou membrane cytoplasmique, constitue une barrière protectrice qui sépare le cytoplasme du périplasm. Elle 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. Ses feuillettes externe et interne forment une bicouche lipidique constituée de phospholipides. Ces derniers sont à 75 % des phosphatidylethanolamines et à 20 % des phosphatidylglycérols. Les 5 % restants sont un mélange de phosphatidylsérines, de cardiolipines et d'undécaprényles mono et diphosphates (Raetz and Dowhan, 1990). De nombreuses protéines sont intégralement localisées dans la membrane interne ou simplement insérées dans cette membrane par un petit domaine transmembranaire alors que les autres domaines sont solubles et exposés vers le cytoplasme ou le périplasm.

Membrane externe

La membrane externe est uniquement présente chez les bactéries à Gram négatif, où elle sert de barrière de perméabilité contre de nombreuses molécules toxiques. Des études récentes ont montré que

la membrane externe joue un rôle dans les propriétés mécaniques de l'enveloppe bactérienne, notamment dans sa rigidité et sa capacité à supporter des déformations, rôle jusqu'alors attribué au seul peptidoglycane (Sun *et al.*, 2022). Elle est également impliquée dans des interactions hôte-pathogène, elle représente un facteur de virulence important et constitue 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 (« *Maintenance of Outer membrane Lipid Asymmetry* ») permet à la bactérie d'assurer cette asymétrie en participant au transport des phospholipides présents dans le feuillet externe de la membrane externe vers la membrane interne (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 responsable des chocs septiques causés par les bactéries à Gram négatif (Raetz and Whitfield, 2002).

Les protéines présentes dans la membrane externe appartiennent à deux grandes classes : (i) les lipoprotéines, ancrées de façon covalente à un phospholipide par un résidu cystéine, et (ii) les protéines β -barrel (également appelées OMP pour « *Outer Membrane Proteins* ») (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 possède un domaine senseur pouvant 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 PLP1a et PLP1b. Chez les Proteobacteria, la lipoprotéine de Braun (Lpp) est ancrée au peptidoglycane par un résidu lysine en position C-terminale et constitue le seul lien covalent entre la membrane externe et le peptidoglycane (Braun and Wolff, 1970; Hantke and Braun, 1973). La Lpp est la protéine la plus abondante chez *E. coli* (environ 10^6 copies par cellule) et joue un rôle important dans l'intégrité de l'enveloppe cellulaire. Pal est une autre lipoprotéine impliquée dans la liaison entre la membrane externe et le peptidoglycane, mais ce lien n'est pas covalent et repose sur des interactions faibles. Pal interagit également avec d'autres protéines pour former le complexe Tol-Pal qui constitue un lien entre la membrane externe et la membrane interne.

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 pour l'entrée spécifique du maltose) (Rollauer *et al.*, 2015). OmpA possède en plus un segment périplasmique qui interagit de façon non covalente avec le peptidoglycane et participe au maintien de la structure de l'enveloppe.

Périplasme

Le périplasme est l'espace situé entre la membrane interne et la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, ou entre la membrane interne et le peptidoglycane chez les bactéries à Gram positif. Il est plus visqueux que le cytoplasme, 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*, les principaux systèmes de réponse aux stress de l'enveloppe sont les systèmes Cpx, Rcs, Bae, Psp et Rse (Delhaye *et al.*, 2019). Le périplasme est le lieu de transit des différents composants de la membrane externe et on y trouve de nombreuses chaperonnes et enzymes impliquées dans le transport de métabolites. Il est traversé par plusieurs machineries multiprotéiques comme les flagelles, les systèmes de pompes à efflux, ou les systèmes de sécrétion. Chez *E. coli*, le périplasme a une épaisseur d'environ 25 nm et une étude a montré que cette épaisseur dépendait de la longueur de la Lpp (Asmar *et al.*, 2017). Il a été démontré que l'augmentation de la taille du périplasme par allongement de la Lpp 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, l'espace périplasmique est occupé par le peptidoglycane, dont les différents aspects structurels et fonctionnels sont décrits en détails dans le chapitre suivant.

II. Le peptidoglycane

1. Structure et fonctions

Le peptidoglycane (PG), également appelé muréine, est un composant essentiel et spécifique de la paroi cellulaire bactérienne [pour une revue, voir (Vollmer *et al.*, 2008)]. Il s'agit d'une macromolécule (10^9 kDa) en forme de « filet » qui entoure la membrane cytoplasmique des bactéries. Sa fonction principale est de préserver l'intégrité cellulaire en fournissant une barrière physique qui protège les bactéries des contraintes mécaniques et osmotiques. Le peptidoglycane contribue également au maintien d'une forme cellulaire définie, sert de point d'ancrage à d'autres composants de l'enveloppe cellulaire tels que des protéines et les acides teichoïques, et joue un rôle important dans les processus de croissance et de division cellulaire.

Le peptidoglycane est un hétéropolymère complexe composé de chaînes glycanes linéaires réticulées par l'intermédiaire de peptides courts pour former un réseau tridimensionnel qui entoure la cellule bactérienne. Les chaînes glycanes sont formées par une alternance de résidus *N*-acétylglucosamine (GlcNAc ou NAG) et acide *N*-acétylmuramique (MurNAc ou NAM) liés entre eux par des liaisons glycosidiques de type β -1 \rightarrow 4. Le groupe D-lactyle de chaque résidu MurNAc porte une tige peptidique dont la composition est le plus souvent la suivante : L-alanine en première position

(L-Ala¹), acide D-glutamique en deuxième position (D-Glu²), acide diaminopimélique en troisième position (DAP³) lié au groupement γ -carboxyle de D-Glu², suivis de deux D-alanine en quatrième et cinquième positions (D-Ala⁴ et D-Ala⁵). Chez les bactéries à Gram positif, DAP³ est souvent amidé ou remplacé par une L-Lysine. Le groupement α -carboxyle de D-Glu² peut également être amidé. Cette liste n'est pas exhaustive et des acides aminés comme la glycine remplace parfois L-Ala¹. Dans le peptidoglycane mature, la partie peptidique est délestée de l'un voire des deux résidus D-Ala terminaux. Cet ensemble forme la sous-unité peptidoglycane de base, plus communément appelée disaccharide-pentapeptide (Figure 2). Les précurseurs de nombreuses bactéries à Gram positif portent une chaîne latérale liée à l'acide aminé en position 3. Ces chaînes latérales sont très variables entre espèces et peuvent être constituées d'acides aminés de configuration D (par exemple D-iAsp et D-iAsn chez *Enterococcus faecium*), L (par exemple L-Ala- L-Ala chez *Enterococcus faecalis*), ou de glycine (par exemple Gly-Gly-Gly-Gly-Gly chez *Staphylococcus aureus*).

Les parties peptidiques de deux sous-unités portées par des chaînes glycanes adjacentes sont reliées entre elles par une liaison amide, généralement formée entre la D-Ala⁴ de la tige peptidique du donneur d'acyl et le DAP³ de la tige peptidique de l'accepteur d'acyl. Cette liaison est alors appelée pont de type 4→3. Il existe aussi une proportion plus ou moins importante de liaisons entre deux DAP³, on parle cette fois de pont de type 3→3. Les ponts de type 4→3 et 3→3 se font soit directement entre deux acides aminés, c'est par exemple le cas chez *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (D-Ala⁴→DAP³), soit par l'intermédiaire de la chaîne latérale, comme chez *S. aureus* (D-Ala⁴→ Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-L-Lys³).

Les caractéristiques structurales décrites ici sont retrouvées chez toutes les espèces bactériennes connues à ce jour. Cependant, un certain degré de variabilité existe au niveau de la tige peptidique, des chaînes glycanes, des ponts (4→3 et 3→3, directs ou indirects) et de leur composition lorsqu'ils ne sont pas directs.

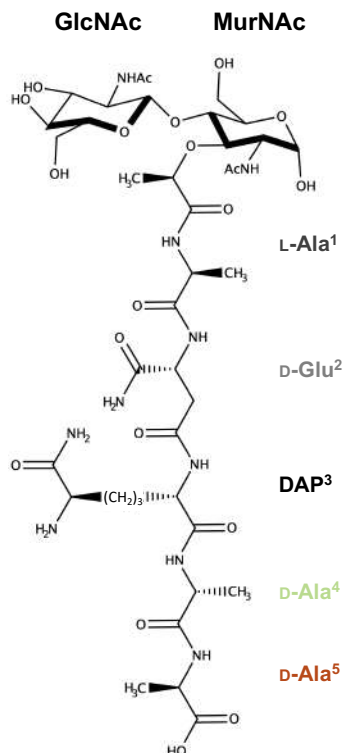


Figure 2. Structure du disaccharide-pentapeptide, sous-unité peptidoglycane de base, chez les bactéries à Gram négatif.

Le peptidoglycane des bactéries à Gram négatif est composé de 1 à 3 couches et s'intercale entre une membrane cytoplasmique et une membrane externe qui délimitent l'espace périplasmique. Le peptidoglycane des bactéries à Gram positif est beaucoup plus épais, formé de 20 couches ou plus, et se trouve à l'extérieur de la membrane cytoplasmique, où il n'est pas protégé par une barrière de perméabilité. Le nombre de couches de peptidoglycane pourrait ne pas être uniforme à la surface des bactéries. Chez *E. coli*, des études par *small-angle neutron scattering* ont indiqué que le sacculus de peptidoglycane était constitué d'un mélange de régions monocouches et tricouches (Labischinski *et al.*, 1991).

La longueur moyenne des chaînes glycanes n'est pas corrélée à l'épaisseur du peptidoglycane. Certaines bactéries à Gram positif possèderaient des chaînes relativement courtes (18 unités disaccharides en moyenne chez *S. aureus*) (Tipper *et al.*, 1967), d'autres de très longues (50 à 250 unités disaccharides chez *Bacillus subtilis*) (Ward, 1973; Warth and Strominger, 1971). Chez les bactéries à Gram négatif, la longueur des chaînes glycanes est de 20 à 40 unités disaccharides en moyenne, comme c'est le cas chez *E. coli* (Glauner *et al.*, 1988). Certaines espèces bactériennes possèdent des chaînes glycanes dont la longueur serait supérieure à cette moyenne (50 unités disaccharides chez *Proteus morgani*) (Quintela *et al.*, 1995) ou inférieure (moins de 10 unités disaccharides chez *Helicobacter pylori*) (Costa *et al.*, 1999).

2. Synthèse des précurseurs

La biosynthèse du peptidoglycane comprend trois étapes principales qui se déroulent successivement au niveau du cytoplasme, de la membrane interne, et du périplasma (Figure 3) [pour une revue, voir (Johnson *et al.*, 2013)].

a) Étapes cytoplasmiques

La synthèse du peptidoglycane débute au niveau du cytoplasme par la formation de deux précurseurs nucléotidiques : l'UDP-*N*-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) et l'UDP-*N*-acétylmuramoyl-pentapeptide (UDP-MurNAc-pentapeptide). Pour cela, du fructose-6-phosphate est d'abord transformé en UDP-GlcNAc, à son tour transformé en UDP-MurNAc, puis la sous-unité peptidique est assemblée pour former l'UDP-MurNAc-pentapeptide. Des synthèses annexes permettent la formation de l'acide D-glutamique et du dipeptide D-alanyl-D-alanine.

*Synthèse de l'UDP-*N*-acétylglucosamine*

L'UDP-GlcNAc est synthétisé à partir du fructose-6-phosphate en quatre étapes faisant intervenir trois enzymes différentes : GlmS, GlmM et GlmU. Lors de la première étape, le fructose-6-phosphate est transformé en glucosamine-6-phosphate sous l'action de la glucosamine-6-phosphate synthase (GlmS). Pendant la deuxième étape, la glucosamine-6-phosphate est transformée en glucosamine-1-phosphate par la phosphoglucosamine mutase (GlmM). La glucosamine-1-phosphate est alors acétylée et uridylée pour former l'UDP-GlcNAc. Ces deux dernières étapes sont catalysées par deux domaines d'une même enzyme, la *N*-acétylglucosamine-1-phosphate uridyltransférase (GlmU).

*Synthèse de l'acide UDP-*N*-acétylmuramique*

La formation de l'UDP-*N*-acétylmuramique (UDP-MurNAc) à partir de l'UDP-GlcNAc se fait en deux étapes et nécessite l'intervention de deux enzymes distinctes : MurA et MurB. Lors de la première étape, catalysée par MurA, un groupement énoypyruvate provenant du phosphoénolpyruvate (PEP) est transféré sur le groupement hydroxyle en position 3 de l'UDP-GlcNAc, ce qui aboutit à la formation de l'UDP-GlcNAc-énoypyruvate. La seconde étape permettant la formation de l'UDP-MurNAc est catalysée par l'enzyme MurB, responsable de la réduction du groupement énoypyruvate de l'UDP-GlcNAc-énoypyruvate. Cette étape met en jeu deux demi-réactions successives. MurB catalyse dans un premier temps la réduction du FAD en FADH₂, ensuite utilisé lors de la deuxième demi-réaction pour

réduire l'UDP-GlcNAc-énolpyruvate afin de former l'UDP-MurNAc. Cette dernière étape de réduction conduit à la formation d'un groupement lactoyl sur lequel sera assemblé la tige pentapeptidique.

Synthèse de l'UDP-MurNAc-pentapeptide

L'UDP-MurNAc-pentapeptide est synthétisé à partir de l'UDP-MurNAc à la suite des actions consécutives de quatre enzymes hautement spécifiques appelées Mur ligases ou Mur synthétases : MurC, MurD, MurE et MurF. Ces quatre enzymes permettent les ajouts successifs de la L-Ala, du D-Glu, d'un acide diaminé tel que le *meso*DAP (essentiellement retrouvé chez les bactéries à Gram négatif) ou la L-Lys (essentiellement retrouvée chez les bactéries à Gram positif), et enfin d'un dipeptide dont la séquence est généralement D-Ala–D-Ala. Ce pentapeptide est greffé au niveau du groupement D-lactoyl de l'UDP-MurNAc.

Voies annexes

On retrouve dans la composition du peptidoglycane des acides aminés de la série D. Ces acides aminés sont bien plus rares que leurs isomères de la série L mais ils sont synthétisés pour intégrer la voie de biosynthèse du peptidoglycane.

La D-Ala est généralement produite à partir de la L-Ala par des alanine racémases. Le dipeptide D-Ala–D-Ala résulte de la condensation de deux molécules de D-Ala par des D-Ala:D-Ala ligases. Le D-glutamate rentre dans la composition du peptidoglycane mais il est également un composant de la capsule chez certaines bactéries. Sa formation peut être catalysée par des D-Ala:D-Glu transaminases ou par des glutamate racémases.

b) Étapes membranaires

Lors des étapes membranaires de la biosynthèse du peptidoglycane, le motif phospho-MurNAc-pentapeptide du précurseur nucléotidique est d'abord ajouté au transporteur lipidique undécaprényl-phosphate (C₅₅-P) pour former le lipide I. Le résidu GlcNAc de l'UDP-GlcNAc est ensuite ajouté au lipide I pour former le lipide II.

Formation du lipide I

L'enzyme *MraY* (phospho-*N*-acétylmuramoyl-pentapeptide transférase) catalyse le transfert du motif phospho-MurNAc-pentapeptide de l'UDP-MurNAc-pentapeptide sur l'undécaprényl-phosphate, permettant ainsi la formation du lipide I (C₅₅-PP-MurNAc-pentapeptide) avec libération d'UMP.

Formation du lipide II

Chez les bactéries à Gram négatif comme *E. coli*, la voie de biosynthèse du peptidoglycane se termine par la synthèse du lipide II. Il est le résultat du transfert d'un résidu GlcNAc issu de l'UDP-GlcNAc sur une molécule de lipide I. Cette réaction a lieu au niveau du groupement hydroxyle en position 4 du MurNAc et du groupement hydroxyle en position 1 de la glucosamine et aboutit à la formation d'une liaison β -1→4 entre ces résidus. Cette réaction est catalysée par l'enzyme *MurG* (également appelée translocase II) et permet la formation du motif disaccharide-pentapeptide, monomère de base du peptidoglycane, porté par le transporteur lipidique undécaprényl-phosphate sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique.

c) Translocation du lipide II à travers la membrane cytoplasmique

La translocation du lipide II à travers la membrane cytoplasmique est une étape essentielle dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane. À l'heure actuelle, l'identité du ou des différents acteurs impliqués dans ce mécanisme n'a pas encore été complètement établie. Des tests *in vivo* et des reconstitutions *in vitro* ont permis d'isoler deux candidats, les protéines *FtsW* et *MurJ*.

La protéine *FtsW* ainsi que son homologue *RodA* retrouvées chez *E. coli* appartiennent à la famille SEDS (Shape, Elongation, Division and Sporulation). Ce sont des protéines intégrales de membrane depuis longtemps considérées comme des acteurs de la translocation du lipide II pour diverses raisons. En effet, ces enzymes sont essentielles dans la voie de biosynthèse du peptidoglycane et elles font partie de complexes multiprotéiques intervenant dans l'élongation et la division. *FtsW* et *RodA* ont été les premières protéines désignées comme étant potentiellement impliquées dans le transport du lipide II. Il a été montré que la protéine *FtsW* de *E. coli* possédait une activité flippase *in vitro* pour le lipide II au sein de protéoliposomes reconstitués, mais également au sein de vésicules membranaires issues d'une souche de *E. coli* surexprimant cette même protéine (Mohammadi *et al.*, 2011). Cependant, les résultats de tests *in vivo* publiés depuis attribuent cette fonction à *MurJ* (Sham *et al.*, 2014). Un autre rôle en tant que peptidoglycane polymérase a été identifié pour *FtsW* (Taguchi *et al.*, 2019) et des études ont démontré que *FtsW* et son homologue *RodA* catalysent la polymérisation des chaînes glycanes (Meeske

et al., 2016). De plus, la structure de RodA, première structure d'une protéine SEDS publiée, n'a pas montré de caractéristiques suggérant un rôle dans la translocation, en particulier la présence d'un canal transmembranaire nécessaire à cette fonction (Sjodt *et al.*, 2018). La possibilité que FtsW puisse agir à la fois comme une peptidoglycane polymérase et une flippase n'a pas été catégoriquement exclue.

Un autre candidat a également été proposé pour la fonction flippase. Il s'agit de la protéine MurJ (ou MviN), une protéine intégrale de membrane essentielle à la synthèse du peptidoglycane chez *E. coli* (Ruiz, 2008). MurJ appartient à la superfamille des exportateurs MOP (Multidrug/Oligosaccharidyl-lipid/Polysaccharide). La déplétion de MurJ chez *E. coli* conduit à des défauts dans la synthèse du peptidoglycane, à l'accumulation d'intermédiaires liés aux lipides du peptidoglycane et à la lyse cellulaire (Inoue *et al.*, 2008). Comme mentionné ci-dessus, MurJ a montré une activité flippase *in vivo*. Dans une proposition de modèle, Kuk *et al.* suggèrent que le lipide II se lie à la protéine MurJ lorsque celle-ci est dans une conformation tournée vers l'intérieur. Ceci entraîne un changement de la conformation de MurJ en une conformation tournée vers l'extérieur, retournant ainsi le lipide II vers la surface extracytoplasmique (Kuk *et al.*, 2017). La dépolarisation membranaire verrouille MurJ dans la conformation tournée vers l'extérieur et bloque ainsi le transport du lipide II (Rubino *et al.*, 2018).

Enfin, des expériences chez des mutants à Gram positif de *B. subtilis* dépourvus de membres de la famille MOP ont permis de mettre en évidence une protéine non-MOP qui n'avait pas été caractérisée auparavant, Amj, possédant également une activité flippase (Meeske *et al.*, 2015). Après identification de Amj par Tn-seq, les auteurs ont découvert que les cellules dépourvues de Amj et MurJ présentaient des défauts de forme et lysaient. De plus, Amj est capable de remplacer MurJ fonctionnellement. Amj, présente dans un sous-ensemble de bactéries à Gram négatif et à Gram positif, serait le membre fondateur d'une nouvelle famille de flippases.

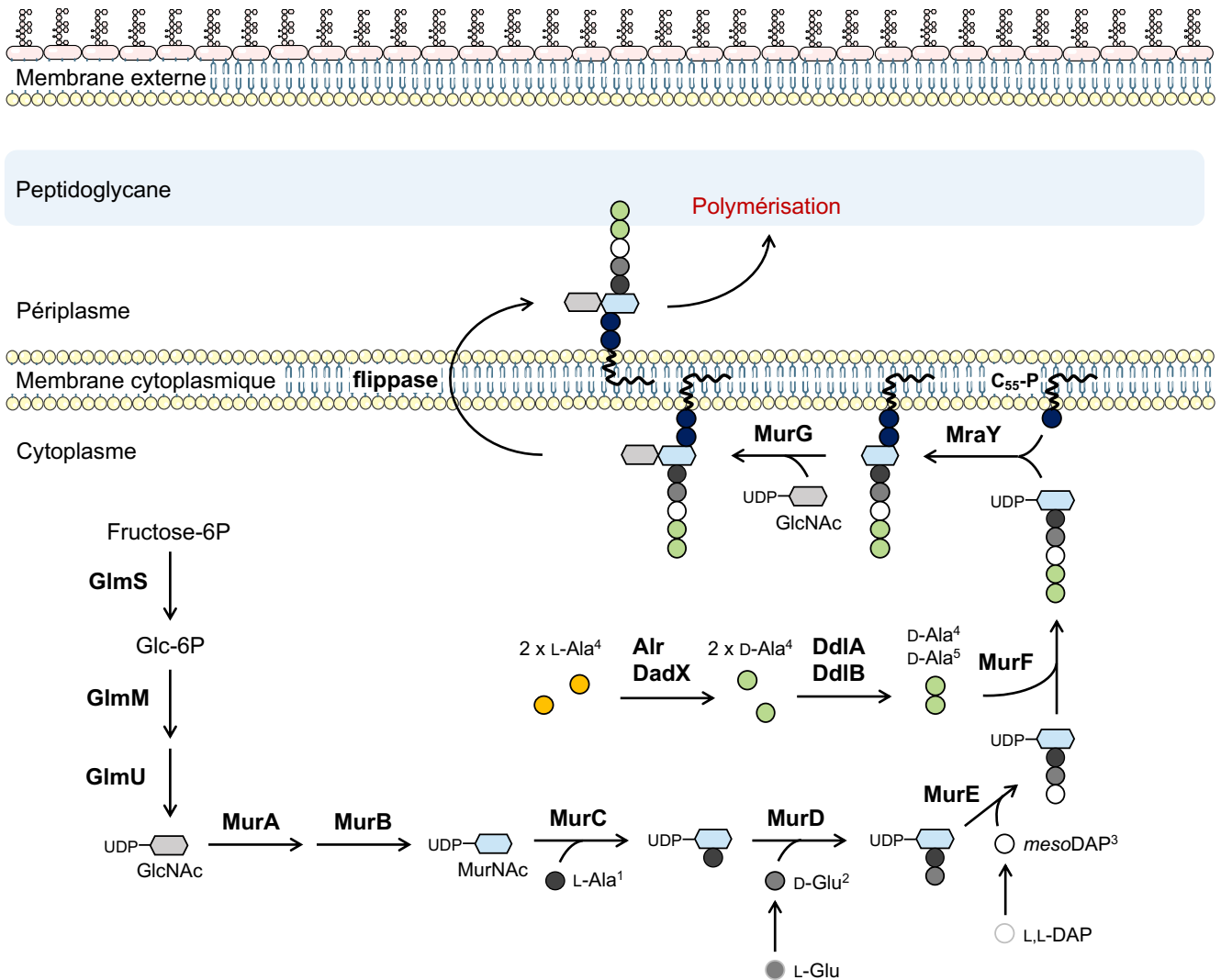


Figure 3. Étapes cytoplasmiques de la synthèse du peptidoglycane d'une bactérie à Gram négatif. Les sucres GlcNAc et MurNAc ainsi que la chaîne pentapeptide sont synthétisés dans le cytoplasme. Le lipide II, constitué de la sous-unité disaccharide-pentapeptide et du transporteur C55 lié par une liaison pyrophosphate, est transloqué jusqu'au périplasm où a lieu la polymérisation du peptidoglycane.

3. Polymérisation

Une fois transloqué du côté périplasmique, le lipide II sert de substrat pour les étapes finales de polymérisation du peptidoglycane qui impliquent deux activités enzymatiques : une activité transglycosylase ou GTase pour la polymérisation des chaînes glycanes et une activité transpeptidase ou TPase pour la formation de ponts qui relient les tiges peptidiques portées par des chaînes glycanes adjacentes (Figure 4). La transglycosylation peut se dérouler indépendamment de la transpeptidation mais la transpeptidation ne se produit pas sans transglycosylation préalable ou simultanée, ce qui suggère que la polymérisation du peptidoglycane débute par l'allongement des chaînes glycanes [pour

une revue, voir (Heijenoort, 2001)]. Ces fonctions sont exercées par des enzymes monofonctionnelles et/ou des enzymes bifonctionnelles interagissant entre elles.

Transglycosylation

La polymérisation du peptidoglycane débute par l'addition successive de sous-unités GlcNAc-MurNAc-pentapeptide, portées par le lipide II, sur une chaîne glycane en croissance. Cette réaction aboutit à la formation de nouvelles liaisons β -1 \rightarrow 4 et entraîne de façon concomitante la libération du C₅₅-PP, recyclé par la suite en C₅₅-P et transporté vers l'intérieur de la cellule. L'élongation de la chaîne glycane en croissance est interrompue par les transglycosylases lytiques qui peuvent cliver la liaison entre le MurNAc et le GlcNAc, ou entre le MurNAc et le lipide II, entraînant la formation d'un résidu anhydro-MurNAc à l'extrémité réductrice de la chaîne glycane.

La réaction de transglycosylation est catalysée par le domaine glycosyltransférase des Protéines de Liaison à la Pénicilline (PLP), nommées ainsi car elles sont la cible de cet antibiotique [pour une revue, voir (Sauvage *et al.*, 2008)]. Ces polymérasés du peptidoglycane ont une structure modulaire et sont classées en fonction de leur activité. Le premier groupe comprend les PLP de haute masse moléculaire (HMM PLP), qui sont des enzymes bifonctionnelles. Leur domaine C-terminal possède une activité D,D-transpeptidase et leur domaine N-terminal possède soit une activité glycosyltransférase (PLP de classe A), soit un rôle dans la morphogénèse (PLP de classe B).

Plus récemment, une activité GTase a été décrite pour la famille des protéines SEDS, et plus particulièrement pour FtsW et RodA (Henrichfreise *et al.*, 2016). Précédemment étudiées pour leur rôle dans la translocation du lipide II à travers la membrane cytoplasmique, elles sont désormais étudiées dans le processus de polymérisation du peptidoglycane. Ces protéines fonctionneraient en tandem avec les PLP de classe B lors de l'élongation ou de la division cellulaire (Sjodt *et al.*, 2020; Taguchi *et al.*, 2019).

Transpeptidation

La réaction de transglycosylation est suivie par une réaction de transpeptidation qui permet la formation d'une liaison amide, reliant classiquement le résidu D-Ala en position 4 d'un pentapeptide donneur d'acyl à l'acide diaminé en position 3 d'un peptide accepteur d'acyl. L'énergie nécessaire à la formation de cette nouvelle liaison peptidique est fournie par la rupture de la liaison D-Ala⁴-D-Ala⁵ du pentapeptide donneur.

Ces ponts peptidiques, appelés ponts de type 4 \rightarrow 3, sont synthétisés par les PLP en deux étapes. Dans un premier temps, la formation d'un acyl-enzyme entre la sérine catalytique des PLP et la fonction carbonyle du résidu D-Ala en position 4 du pentapeptide donneur entraîne le départ du résidu D-Ala en

position 5. L'acyl-enzyme est ensuite attaqué par la fonction amine du peptide accepteur, ce qui aboutit à la formation d'une nouvelle liaison amide. Cette réaction est catalysée par le domaine D,D-transpeptidase des PLP.

D'autres protéines intervenant dans la réticulation du peptidoglycane ont également été identifiées (Mainardi *et al.*, 2000, 2005). Les L,D-transpeptidases (LDT) synthétisent des ponts peptidiques de type 3→3 qui relient le résidu en position 3 de la tige peptidique donneuse d'acyle au résidu en position 3 de la tige acceptrice d'acyle. Comme décrit précédemment, les D,D-transpeptidases classiques appartenant à la famille des PLP catalysent la formation de ponts de type 4→3 reliant le résidu en position 4 de la tige peptidique donneuse d'acyle au résidu en position 3 de la tige acceptrice d'acyle. Les transpeptidases sont nommées d'après la configuration des acides aminés qui bordent la liaison clivée au niveau de la tige peptidique donneuse d'acyle : D-Ala⁴-D-Ala⁵ pour les D,D-transpeptidases appartenant à la famille des PLP et L-Lys³-D-Ala⁴ pour les L,D-transpeptidases.

Le mécanisme catalytique de la famille des LDT est similaire à celui des PLP mais ici, le donneur d'acyle est un tétrapeptide produit par l'hydrolyse de la D-Ala en position 5 d'un pentapeptide par une D,D-carboxypeptidase. Les L,D-transpeptidases ne sont pas apparentées aux PLP d'un point de vue structural et le résidu catalytique impliqué dans la formation de l'acyl-enzyme n'est pas une sérine mais une cystéine. Alors que la formation des ponts de type 4→3 par les PLP est en général inhibée par tous les antibiotiques de la famille des β-lactamines, la formation des ponts de type 3→3 par les L,D-transpeptidases est efficacement inhibée par une seule classe de β-lactamines, les carbapénèmes.

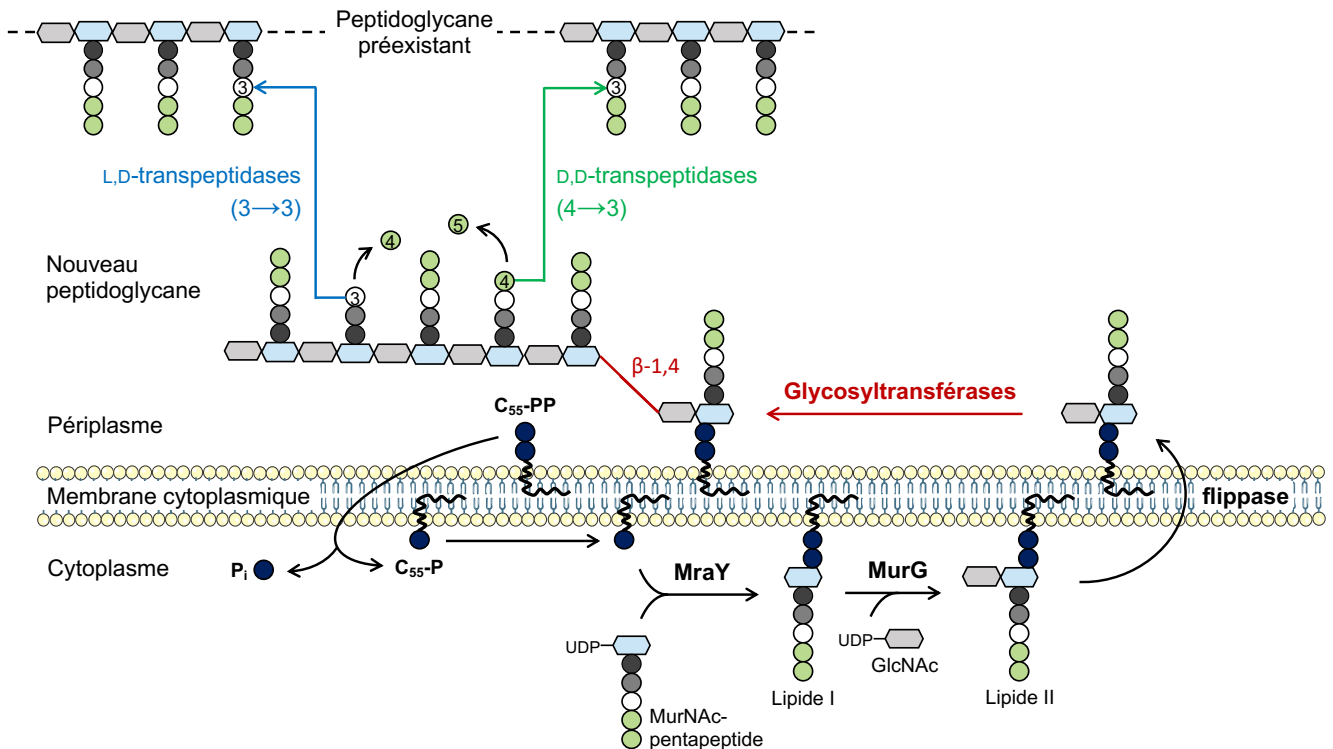


Figure 4. Étapes périplasmiques de la synthèse du peptidoglycane d’une bactérie à Gram négatif.

Dans le périplasm, les chaînes glycanes sont formées par les glycosyltransférases qui catalysent la formation de liaisons glycosidiques β -1,4 (rouge) entre le GlcNAc d’une molécule de lipide II et le MurNAc d’une chaîne glycanes en cours d’expansion. La formation de cette liaison libère le transporteur C₅₅-PP qui est recyclé en C₅₅-P puis transloqué dans le cytoplasme. Les nouvelles chaînes glycanes sont incorporées dans le 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, flèche verte) ou reliant deux résidus en position 3 (ponts 3→3 catalysés par les L,D-transpeptidases, flèche bleue). C₅₅-P : undécaprényl phosphate ; C₅₅-PP : undécaprényl pyrophosphate.

a) Les protéines de liaison à la pénicilline

Classification et structure des PLP

Les protéines de liaison à la pénicilline sont appelées ainsi parce qu’elles ont été identifiées grâce à leur capacité à se lier de manière covalente à la pénicilline, le premier membre de la famille des β -lactamines (Tipper and Strominger, 1965; Wise and Park, 1965). Les bactéries possèdent un nombre variable de PLP. Les PLP sont classées en deux grands groupes : les PLP de haut poids moléculaire, qui comprennent les PLP de classe A et B (PLPa et PLPb) et les PLB de bas poids moléculaire, souvent regroupées sous le terme de PLP de classe C (PLPc) [pour une revue, voir (Sauvage *et al.*, 2008)].

Historiquement, pour chaque espèce, les PLP ont été identifiées après réaction d’extraits membranaires avec de la pénicilline radiomarquée et séparation par gel SDS-PAGE. Elles ont alors été

numérotées en fonction de leur mobilité électrophorétique relative (Spratt and Pardee, 1975). Cette classification peut porter à confusion, la numérotation des PLP orthologues variant d'un organisme à un autre.

Les PLP de haut poids moléculaire sont des PLP multimodulaires directement impliquées dans la polymérisation du peptidoglycane. Ces PLP sont des molécules associées à la membrane cytoplasmique qui présentent une courte région cytoplasmique à leur extrémité N-terminale suivie d'un segment transmembranaire [pour une revue, voir (Macheboeuf *et al.*, 2006)]. Leur extrémité C-terminale porte un domaine transpeptidase qui catalyse la formation d'une liaison entre deux chaînes glycanes adjacentes par la formation des ponts de type 4→3. Selon la structure et l'activité catalytique de leur domaine en N-terminal, ces enzymes appartiennent soit à la classe A, soit à la classe B des PLP. Chez les PLP de classe A, l'extrémité N-terminale porte un domaine glycosyltransférase qui catalyse l'élongation des chaînes glycanes non réticulées. Chez les PLP de classe B, le domaine en N-terminal jouerait un rôle dans la morphogénèse cellulaire en interagissant avec d'autres protéines impliquées dans le cycle cellulaire. Des domaines additionnels peuvent être présents comme les domaines de fixation aux lipoprotéines LpoA et LpoB chez les PLP de classe A de *E. coli*.

Les PLP de bas poids moléculaire présentent une activité D,D-carboxypeptidase, clivant la liaison D-Ala⁴-D-Ala⁵ de la tige pentapeptidique pour générer un térapeptide, ou une activité endopeptidase qui permet de couper les ponts formés par transpeptidation.

Le site catalytique des PLP présente trois motifs conservés : SxxK, SxN et KTG(T/S) (où x désigne un résidu variable) (Goffin and Ghuysen, 1998). La sérine du motif SxxK est le résidu catalytique essentiel pour l'activité enzymatique. Les deux autres motifs forment les parois de la cavité catalytique. L'agencement tridimensionnel de ces trois motifs les uns par rapport aux autres définit le site actif caractéristique des D,D-transpeptidases et D,D-carboxypeptidases.

L'exemple de la structure de la PLP1b de *E. coli*, récemment résolue par cryo-microscopie électronique sous sa forme apo, est présenté dans la Figure 5.

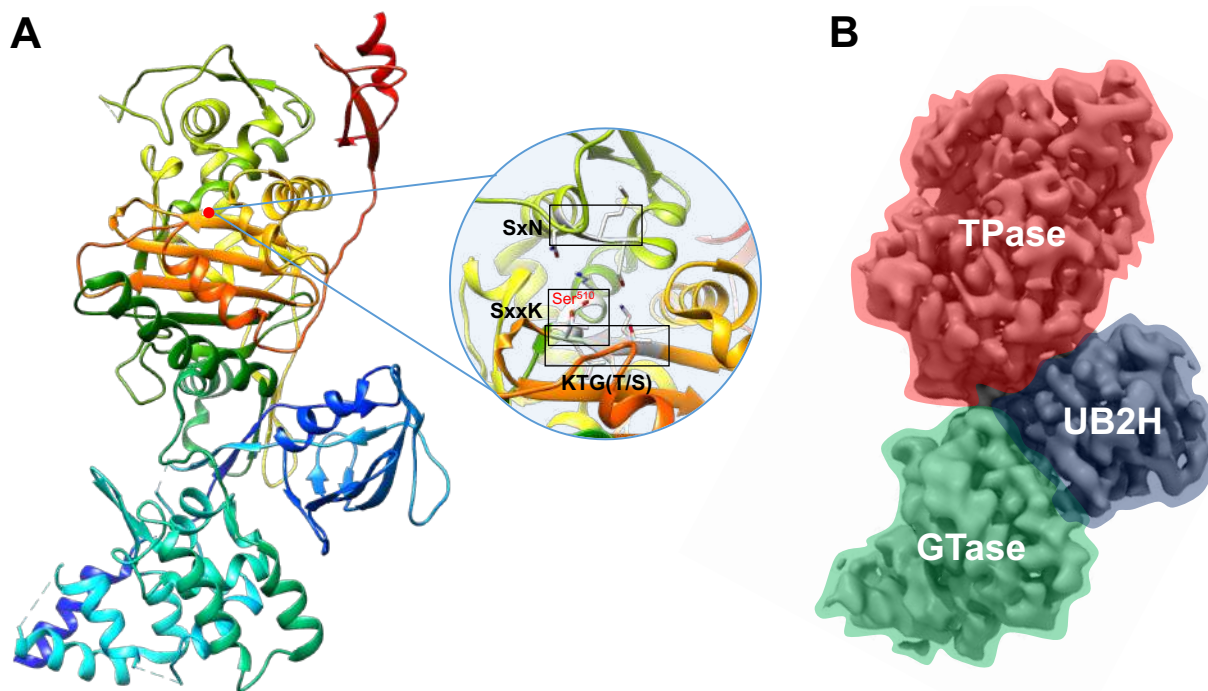


Figure 5. Structure de la PLP1b de *E. coli* obtenue par cryo-microscopie électronique.

(A) Structure de la PLP1b de *E. coli* (PDB 7LQ6). La PLP1b est colorée en arc-en-ciel de l'extrémité N-terminale (bleue) à l'extrémité C-terminale (rouge). Le rond bleu permet de voir l'architecture du site actif de la PLP1b plus en détails. Les atomes d'azote sont colorés en bleu, les atomes d'oxygène sont colorés en rouge et les atomes de soufre sont colorés en jaune. Les trois motifs conservés SxxK, SxN et KTG(T/S) sont encadrés en noir. Le motif SxxK comporte le nucléophile (Ser⁵¹⁰ écrit en rouge) et la base nécessaire à son activation (Lys⁵¹³). Le motif SxN est impliqué dans la protonation du groupement amine partant, et le motif KTG(T/S) est impliqué dans la liaison au substrat. (B) Carte de densité de microscopie électronique de la PLP1b de *E. coli* (EMD-23482). Le domaine GTase N-terminal est coloré en vert, le domaine TPase C-terminal est coloré en rouge et le domaine UB2H central est coloré en bleu. UB2H assure la liaison entre LpoB et la PLP1b.

[Adaptée de (Caveney et al., 2021)]

Mécanisme catalytique des PLP

Le mécanisme catalytique des PLP comprend deux étapes (Figure 6) :

- (i) Lors de la première étape, commune à toutes les PLP, le groupement hydroxyle de la sérine catalytique attaque le groupement carbonyle de la liaison peptidique D-Ala⁴–D-Ala⁵ d'un donneur d'acyle pentapeptidique. Cette attaque nucléophile aboutit à la formation d'une liaison ester entre le groupement carbonyle de la D-Ala⁴ et l'oxygène porté par le carbone β de la sérine. La formation de cet adduit covalent, appelé acyl-enzyme, s'accompagne de la libération de la D-Ala⁵.
- (ii) La seconde étape diffère en fonction des PLP. Elle permet la formation d'un pont interpeptidique (D,D-transpeptidation, chez les PLP de classes A et B) ou l'hydrolyse de

l'acyl-enzyme (D,D-carboxypeptidation, chez les PLP de classe C). 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 acceptrice d'acyle. Cette réaction libère l'enzyme et entraîne la formation d'un pont interpeptidique de type 4→3 reliant la D-Ala⁴ du donneur au résidu en position 3 de l'accepteur. 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 térapeptidique.

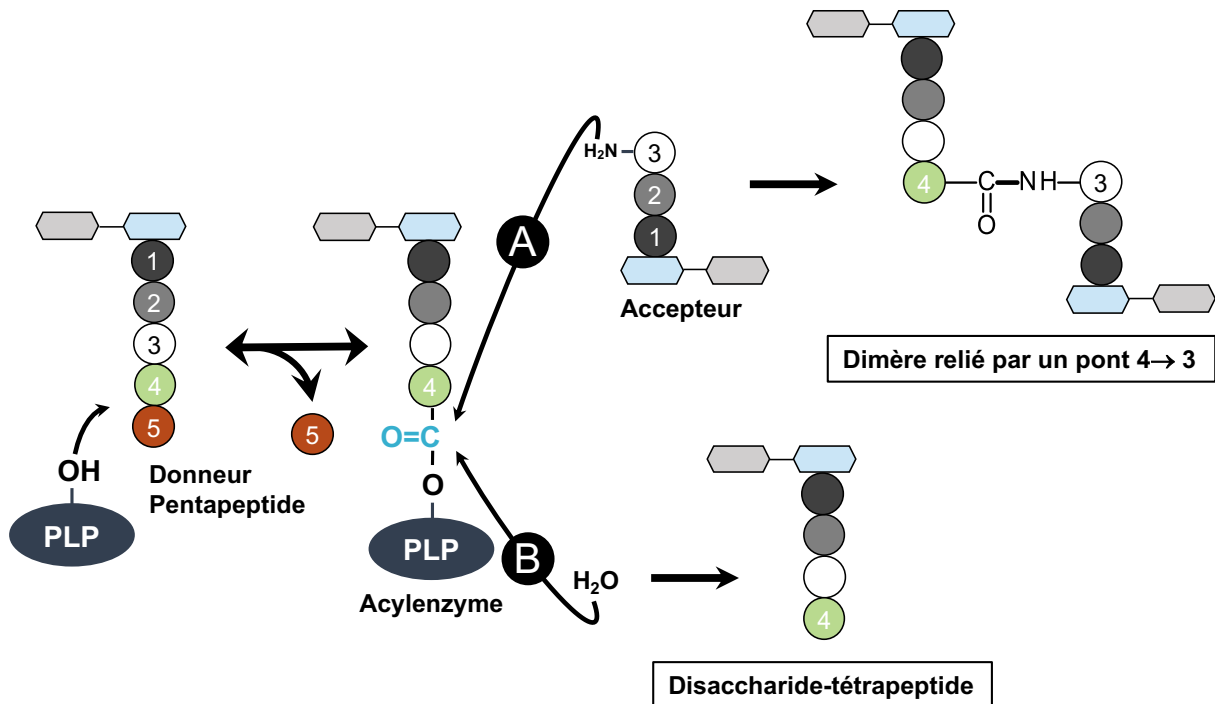


Figure 6. Réactions de D,D-transpeptidation et D,D-carboxypeptidation catalysées par les PLP.

L'attaque nucléophile de la sérine catalytique de la PLP sur la liaison amide reliant la D-Ala⁴ à la D-Ala⁵ d'une tige pentapeptidique donneuse entraîne la formation d'un acyl-enzyme reliant la sérine catalytique de la PLP à la D-Ala⁴ de la tige donneuse par une liaison ester et la libération de la D-Ala⁵. Deux cas de figure sont représentés ici pour la deuxième étape : en haut (réaction A), le groupement amine du résidu en position 3 d'une tige acceptrice attaque la liaison ester et forme un dimère relié par un pont de type 4→3 (D,D-transpeptidation) ; en bas (réaction B), une molécule d'eau attaque la liaison ester et libère l'enzyme et la tige térapeptidique (D,D-carboxypeptidation).

Les PLP de E. coli et de P. aeruginosa

La plupart des bactéries produisent plusieurs PLP de classe A, B et C aux fonctions partiellement redondantes. *E. coli* possède douze PLP : trois PLP de classe A (PLP1a, PLP1b et PLP1c, encodées respectivement par les gènes *mrcA* ou *ponA*, *mrcB* ou *ponB* et *pbpC*), deux PLP de classe B (PLP2 et PLP3, encodées respectivement par les gènes *mrda* et *ftsI*) et sept PLP de classe C (PLP4, PLP4b, PLP5,

PLP6a, PLP6b, PLP7 et AmpH, encodées respectivement par les gènes *dacB*, *yfeW*, *dacA*, *dacC*, *dacD*, *pbpG* et *ampH*).

Chez *P. aeruginosa*, on dénombre pour le moment huit PLP : deux PLP de classe A (PLP1a et PLP1b, encodées respectivement par les gènes *ponA* et *ponB/mrcB*), trois PLP de classe B (PLP2, PLP3 et PLP3a/3x, encodées respectivement par les gènes *pbpA*, *fstI/pbpB* et *pbpC*) et trois PLP de classe C (PLP4, PLP5/6 et PLP7, encodées respectivement par les gènes *dacB*, *dacC* et *pbpG*). Les homologies entre les PLP de *E. coli* et de *P. aeruginosa* sont présentées dans le Tableau 1.

Classe	PLP de <i>E. coli</i>	Gène de <i>E. coli</i>	PLP correspondante chez <i>P. aeruginosa</i>	Gène correspondant chez <i>P. aeruginosa</i>	Référence
A	1a	<i>ponA/mrcA</i>	1a	<i>ponA</i>	(Handfield <i>et al.</i> , 1997)
A	1b	<i>ponB/mrcB</i>	1b	<i>ponB/mrcB</i>	(Nakagawa <i>et al.</i> , 1984)
A	1c	<i>pbpC</i>	Absente	NA	
B	2	<i>pbpA</i>	2	<i>pbpA</i>	(Legaree <i>et al.</i> , 2007)
B	3	<i>fstI</i>	3	<i>fstI/pbpB</i>	(Liao and Hancock, 1997a)
B		Absente	3a/3x (homologue)	<i>pbpC</i>	(Liao and Hancock, 1997b)
C	4	<i>dacB</i>	4	<i>dacB</i>	(Korat <i>et al.</i> , 1991)
C	4b	<i>yfeW</i>	Absente	NA	
C	5	<i>dacA</i>	5/6	<i>dacC</i>	(Noguchi <i>et al.</i> , 1979)
C	6	<i>dacC</i>	Absente	NA	
C	6b	<i>dacD</i>	Absente	NA	
C	7	<i>pbpG</i>	7	<i>pbpG</i>	(Song <i>et al.</i> , 1998)
C	AmpH	<i>AmpH</i>	Absente	NA	

Tableau 1. Classification des PLP de *E. coli* et correspondance chez *P. aeruginosa*.

[Adapté de (Farra *et al.*, 2008)]

b) Les L,D-transpeptidases

Les ponts de type 4→3 synthétisés par les PLP ne sont pas les seuls ponts retrouvés dans le peptidoglycane [pour une revue, voir (Aliashkevich and Cava, 2022)]. Des ponts de type 3→3 ont été détectés à la fin des années 1960 dans le peptidoglycane de *E. coli* (Schwarz *et al.*, 1969) et les enzymes responsables de leur formation, appelées L,D-transpeptidases, ont été identifiées au début des années 2000 par le laboratoire d'accueil (Mainardi *et al.*, 2000, 2005). Les LDT sont des enzymes à cystéine active, structurellement non apparentées aux PLP, avec une spécificité de substrat et une sensibilité aux β-lactamines différentes.

Le peptidoglycane de *E. coli* contient environ 6 % de ponts de type 3→3 en phase exponentielle de croissance et 13 % en phase stationnaire (Blasco *et al.*, 1988; Glauner *et al.*, 1988; Pisabarro *et al.*, 1985). Cette proportion peut atteindre 60 à 80 % chez *Clostridioides difficile*, *Mycobacterium abscessus* et *Mycobacterium tuberculosis* (Lavollay *et al.*, 2008, 2011; Peltier *et al.*, 2011). L'étude du rôle physiologique des LDT constitue un domaine de recherche important sur lequel de nombreux

scientifiques se penchent, notamment pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques.

Découverte et identification des LDT

Le rôle des LDT dans la résistance aux antibiotiques a été caractérisé pour la première fois chez un mutant de *E. faecium* hautement résistant à l'ampicilline sélectionné *in vitro* (Mainardi *et al.*, 2000). L'objectif initial était alors d'identifier les mutations conférant une résistance à l'ampicilline chez la bactérie à Gram positif *E. faecium*. La souche de départ, appelée D344S et très sensible à l'ampicilline, dérivait de *E. faecium* D344 par une délétion spontanée comprenant le gène codant pour la PLP5. Cette souche avait été choisie pour éviter de sélectionner des mutants résistants à l'ampicilline à cause de diverses altérations de la PLP5. Après cinq étapes de sélection consécutives sur des milieux contenant des concentrations croissantes d'ampicilline, un mutant hautement résistant appelé M512 a été isolé. Alors que la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'ampicilline était de 0,06 µg/ml pour D344S, elle était au moins 30 000 fois supérieure chez M512 (>2000 µg/ml). L'analyse de la composition du peptidoglycane des deux souches par Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (ou High Performance Liquid Chromatography, HPLC) couplée à la spectrométrie de masse (ou Mass Spectrometry, MS) a révélé que la totalité des ponts de type 4→3 (entre la D-Ala⁴ et D-iAsn-L-Lys³) de la souche sensible D344S étaient remplacés par des ponts de type 3→3 (entre la L-Lys³ et D-iAsn-L-Lys³) chez le mutant résistant M512. En parallèle, l'analyse du peptidoglycane des mutants M1, M2, M3 et M4 issus des quatre premières étapes de sélection (avant la sélection de M512) a permis de révéler la corrélation entre l'augmentation de la résistance à l'ampicilline et le remplacement progressif des ponts de type 4→3 par des ponts de type 3→3 (Tableau 2) (Mainardi *et al.*, 2002). Cette étude a permis de mettre en évidence le contournement de l'activité transpeptidase des PLP par les LDT insensibles aux β-lactamines, conférant ainsi au mutant M512 une résistance à l'ampicilline.

Souche	Concentration d'ampicilline (mg/ml)	CMI de l'ampicilline (mg/ml)	Proportion des ponts de type 3→3 (%)
D344S	0,03	0,06	25
M1	0,12	0,5	64
M2	0,25	1	67
M3	0,5	2	73
M4	0,5	128	82
M512	1000	>2000	100

Tableau 2. Proportion des ponts de type 3→3 et CMI de l'ampicilline chez les mutants de D344S.
[Adapté de (Mainardi *et al.*, 2002)]

L'enzyme responsable de la formation des ponts de type 3→3 chez le mutant M512 a été identifiée grâce à un essai enzymatique radioactif en utilisant un extrait brut de M512 et deux substrats : un analogue synthétique du substrat (Ac²-L-Lys-D-Ala) imitant l'extrémité C-terminale du donneur tétrapeptidique et la [¹⁴C]D-Ala (Mainardi *et al.*, 2005). L'enzyme a catalysé l'échange du résidu D-Ala terminal non radioactif de l'analogue du substrat par la [¹⁴C]D-Ala radioactive. Le produit, Ac²-L-Lys-[¹⁴C]D-Ala, a été identifié par HPLC couplée à un radio-détecteur. La purification partielle de la L,D-transpeptidase de *E. faecium*, appelée Ldt_{fm}, a donné accès à la séquence N-terminale de la protéine, permettant ainsi d'identifier le gène codant pour Ldt_{fm} dans le génome de *E. faecium*. La surexpression de ce gène chez *E. coli* a alors permis de purifier l'enzyme en quantités suffisamment importantes pour la réalisation d'études fonctionnelles et structurales. Ldt_{fm} s'est avérée être sélectivement active sur les tétrapeptides se terminant par D-Ala, et aucune activité n'a été détectée avec le substrat pentapeptidique des PLP. La substitution de D-Lys³ par D-iAsn sur la tige peptidique acceptrice d'acyle s'est également avérée essentielle, Ldt_{fm} étant capable de catalyser des réactions utilisant des peptides ne portant pas de chaînes latérales comme donneurs mais pas comme accepteurs. Enfin, le résidu Cys⁴⁴² hautement conservé a été identifié comme étant le résidu catalytique de Ldt_{fm}, aucune activité n'ayant été détectée avec un mutant C442A. De plus, l'acylation de Ldt_{fm} par le méropénème se produit sur le résidu C⁴⁴². Ldt_{fm} est donc le premier représentant caractérisé d'une nouvelle famille d'enzymes qui ne présente pas de similarité avec les PLP classiques, tant en termes de sélectivité du substrat (tétrapeptidique pour Ldt_{fm}, pentapeptidique pour les PLP) que de résidu catalytique (Cys pour Ldt_{fm}, Ser pour les PLP).

Structure des LDT

Les études structurales des LDT provenant de diverses bactéries ont permis de révéler une architecture non apparentée à celle des PLP (Biarrotte-Sorin *et al.*, 2006; Böth *et al.*, 2013; Correale *et al.*, 2013; Caveney *et al.*, 2019). Les LDT se présentent sous forme monomérique et sont composées d'un domaine catalytique C-terminal et d'un domaine non catalytique N-terminal, souvent connecté à un segment transmembranaire. Le domaine C-terminal est un domaine « YkuD », nommé ainsi pour sa ressemblance avec la L,D-transpeptidase putative YkuD de *B. subtilis*, première structure cristalline d'une LDT publiée (Bielnicki *et al.*, 2005). Ce domaine contient des résidus conservés impliqués dans le mécanisme catalytique des LDT. Le domaine N-terminal assurerait quant à lui un positionnement optimal du domaine transpeptidase sur la couche de peptidoglycane en l'espaçant de la membrane cytoplasmique. Ce domaine pourrait également être impliqué dans les interactions avec le peptidoglycane. L'architecture globale des LDT et le nombre de domaines varie en fonction des espèces bactériennes (Figure 7).

La taille et le nombre de domaines des LDT d'une même bactérie peuvent également varier. Chez *M. tuberculosis*, Ldt_{M1} et Ldt_{M3} sont plus petites que Ldt_{M2} et Ldt_{M5} qui possèdent un domaine

supplémentaire de type immunoglobuline appelé BlgA. Ce domaine pourrait jouer un rôle de piédestal servant à rapprocher le site catalytique des LDT fixées à la membrane cytoplasmique de leurs substrats situés dans les différentes couches du peptidoglycane (Figure 7).

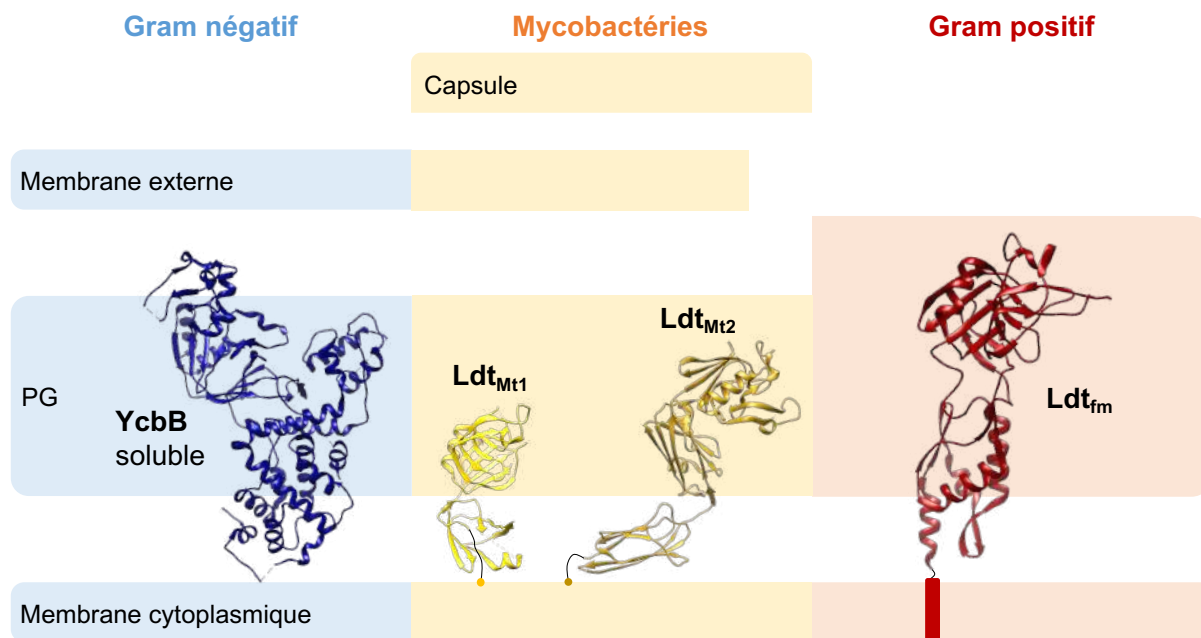


Figure 7. Diversité structurale des LDT.

YcbB (PDB 6NTW) est une LDT soluble dans le périplasme de *E. coli* (fond bleu). Ldt_{Mt1} (PDB 5E5L) et Ldt_{Mt2} (PDB 5DU7) sont des lipoprotéines retrouvées chez *M. tuberculosis* (fond jaune). Ldt_{fm} (PDB 1ZAT) est ancrée à la membrane de *E. faecium* (fond rouge).

[Adaptée de (Caveney et al., 2019)]

La structure de YcbB de *E. coli*, aussi appelée LdtD, acylée avec le méropénème a été résolue en 2019 (Caveney *et al.*, 2019). YcbB est constituée du domaine catalytique L,D-transpeptidase canonique, comprenant le motif conservé [S/T]xGCh[R/N] (où x désigne un résidu variable et h un résidu hydrophobe), avec l'ajout notable d'un sous-domaine flexible de « coiffage » du substrat. L'architecture de ce sous-domaine varie dans les structures de LDT résolues à ce jour, d'une simple boucle pour YkuD de *B. subtilis* à de grandes boucles comprenant jusqu'à 19 résidus pour la Ldt_{fm} de *E. faecium*. On retrouve également un domaine de liaison au peptidoglycane entre les domaines N-ter et C-ter et un domaine 'scaffold' potentiellement impliqué dans des interactions avec la PLP5 et la PLP1b, partenaires connus de YcbB (Hugonnet *et al.*, 2016). Contrairement aux LDT des bactéries à Gram positif ou des mycobactéries, YcbB ne possède ni attache transmembranaire ni lipidation N-terminale mais pourrait être adressée au périplasme à l'aide d'une séquence de signalisation dépendante de la voie Sec, ensuite clivée pour libérer YcbB soluble. La structure de l'adduit covalent formé par acylation de YcbB par le méropénème est décrite en détails dans la Figure 8.

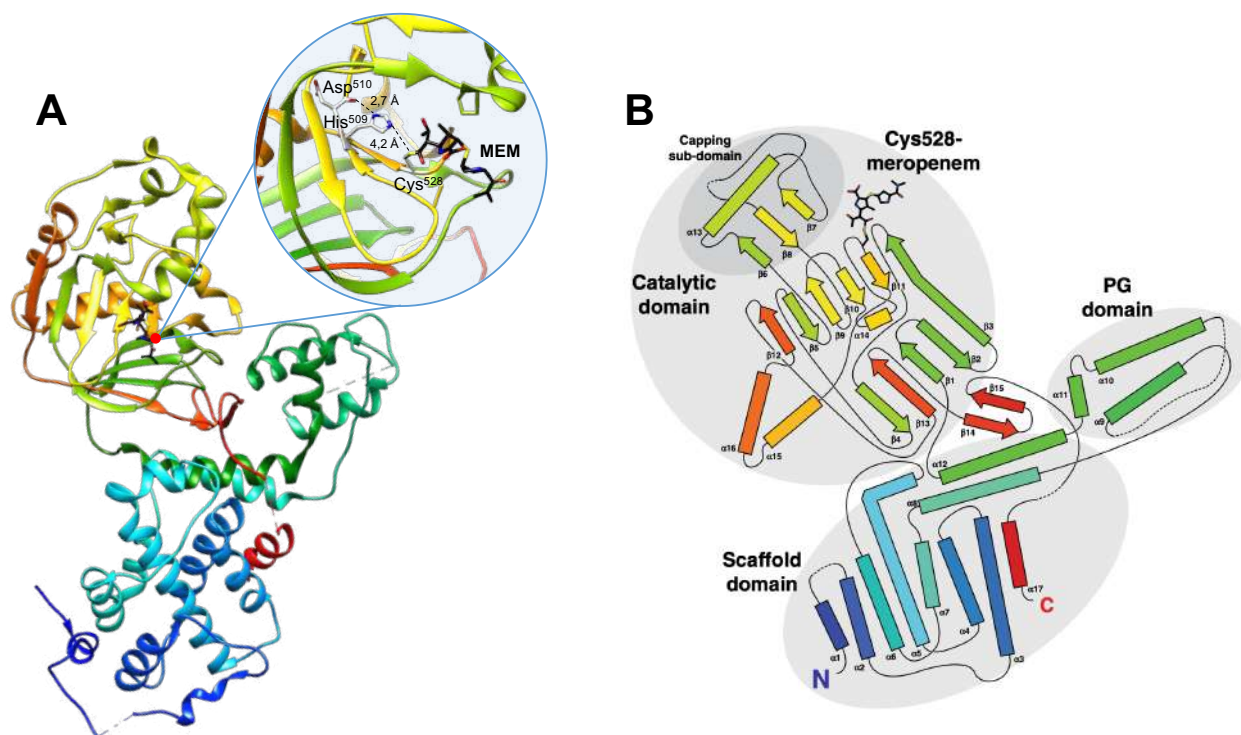


Figure 8. Structure de l'adduit covalent formé par acylation de YcbB par le mérépénème.

(A) Structure cristalline de l'adduit covalent formé par acylation de YcbB par le mérépénème (PDP 6NTW). YcbB est colorée en arc-en-ciel de l'extrémité N-terminale (bleue) à l'extrémité C-terminale (rouge). Le mérépénème est coloré en noir, et par hétéroatome. Le rond bleu permet de voir l'architecture du site actif de YcbB plus en détails. La cystéine catalytique (Cys⁵²⁸), ici acylée par le mérépénème coloré en noir, est située à proximité de l'histidine conservée (His⁵⁰⁹). Les atomes d'azote sont colorés en bleu, les atomes d'oxygène sont colorés en rouge et les atomes de soufre sont colorés en jaune. La distance entre le N^ε (azote ne position 3) de la base His⁵⁰⁹ et le soufre du nucléophile Cys⁵²⁸ acylé est de 4,2 Å. La fonction carbonyle de la chaîne principale de l'Asp⁵¹⁰ est situé près du N^π (azote en position 1) de His⁵⁰⁹ (à une distance de 2,7Å), formant une liaison hydrogène stabilisante et modulant potentiellement le pKa de His⁵⁰⁹ pour améliorer son rôle de base générale. MEM, mérépénème. (B) Diagramme topologique de l'adduit covalent formé par acylation de YcbB par le mérépénème. La coloration utilisée est la même que pour la représentation en (A). Les différents domaines sont annotés et entourés en gris.

[(A) Adaptée de (Caveney et al., 2019) ; (B) extraite de (Caveney *et al.*, 2019)]

Résistance aux β-lactamines médiée par les LDT

Comme décrit dans les sections précédentes, les premières études sur les LDT ont permis de voir que celles-ci conféraient un haut niveau de résistance à l'ampicilline (une β-lactamine de la classe des pénèmes) dans les différents mutants de *E. faecium*. Les études structurales ont montré qu'elles n'étaient pas structurellement apparentées aux PLP et ne possédaient aucun des motifs conservés de ces dernières. On a d'abord pensé que les LDT n'étaient pas inactivées par les β-lactamines, contrairement aux PLP.

Des études ultérieures ont cependant montré que les LDT étaient efficacement inhibées par une seule classe de β -lactamine, les carbapénèmes et pourraient donc favoriser la résistance aux β -lactamines (Mainardi *et al.*, 2007; Triboulet *et al.*, 2013). Enfin, il faut noter que les LDT sont inhibées par les ions cuivre (Cu^{2+}) (Peters *et al.*, 2018) ainsi que par les inhibiteurs de β -lactamase appartenant à la famille des diazabicyclooctane (DBO) (Edoo *et al.*, 2018) qui se lient à la cystéine catalytique de *E. coli* et de *E. faecium*.

L'absence d'inhibition des LDT par la plupart des β -lactamines indique que ces enzymes pourraient favoriser l'émergence de résistances à ces antibiotiques. C'est le cas du mutant de *E. faecium* M512, dans laquelle l'essentialité des PLP peut être contournée par Ldt_{fm} insensible à l'ampicilline (Tableau 2) (Mainardi *et al.*, 2000). Cette résistance nécessite également l'activité d'une métallo-D,D-carboxypeptidase cytoplasmique DdcY, homologue de VanY impliqué dans la résistance à la vancomycine chez les entérocoques (Arthur *et al.*, 1999) et codé par le gène *ddcY*. En clivant la D-Ala terminale dans un UDP-MurNAc-pentapeptide, DdcY fournit le précurseur térapeptidique substrat des LDT (Sacco *et al.*, 2010). Cette D,D-carboxypeptidase est silencieuse dans la souche parentale D344S et son expression est contrôlée par un système à deux composants appelé DdcR (régulateur) / DdcS (senseur). La surproduction de DdcY dans le mutant M512 est liée à la substitution T161A dans le senseur DdcS qui abolit son activité phosphatase. L'augmentation de l'activité D,D-carboxypeptidase est nécessaire mais pas suffisante pour le contournement des PLP par Ldt_{fm} , l'expression ectopique de *ddcY* ne conférant pas la résistance à l'ampicilline à la souche parentale et augmentant même le niveau de résistance chez le mutant M1. Or, M1 possède une mutation dans un opéron comprenant les gènes *stpA*, qui code pour une sérine-thréonine protéine phosphatase, et *stkA*, qui code pour une sérine-thréonine protéine kinase. Cette mutation inactive la phosphatase StpA, induisant une hyperphosphorylation de plusieurs protéines par StkA (Sacco *et al.*, 2014). La résistance aux β -lactamines médiée par le contournement des PLP par Ldt_{fm} chez *E. faecium* nécessite donc deux facteurs essentiels : (i) la surproduction de la D,D-carboxypeptidase DdcY, qui fournit le substrat térapeptidique de Ldt_{fm} , et (ii) une hyperphosphorylation de certaines protéines par la kinase StkA (Sacco *et al.*, 2015).

Dans une étude publiée en 2016, le laboratoire d'accueil a montré que la résistance aux β -lactamines médiée par les LDT était également possible chez *E. coli* (Hugonnet *et al.*, 2016). Ces travaux ont permis d'observer que la surexpression de *ycbB* n'était pas suffisante pour conférer une résistance aux β -lactamines et que, comme chez *E. faecium*, des facteurs supplémentaires étaient nécessaires pour activer le mécanisme de résistance. L'étude a montré que la surproduction de l'alarmone (p)ppGpp (guanosine 5'-[di/tri]phosphate 3'-diphosphate) par l'enzyme RelA était également nécessaire pour la résistance aux β -lactamines. La synthèse du (p)ppGpp est déclenchée par les bactéries qui rencontrent des conditions environnementales limitant leur croissance, entraînant une cascade d'évènements complexe appelée réponse stringente. Le rôle du (pp)Gpp dans l'expression de la résistance aux β -lactamines

médiée par YcbB est en cours d'étude au laboratoire. La résistance aux β -lactamines médiée par le contournement des PLP par YcbB chez *E. coli* nécessite donc deux facteurs essentiels : (i) la surproduction de YcbB et (ii) une surproduction de l'alarmone (p)ppGpp. Cette surproduction est due à des mutations qui induisent la réponse stringente en provoquant une accumulation d'ARNt non-chargés, elle-même liée à une activité diminuée des aminoacyl-tRNA synthétase tel que IleRS.

Les auteurs ont ensuite recherché les partenaires fonctionnels de YcbB dans la synthèse du peptidoglycane. Pour cela, ils ont sélectionné des mutants résistants à l'ampicilline en surexprimant *ycbB* dans différentes souches portant la délétion d'un gène codant pour un partenaire potentiel de YcbB. Ils ont alors observé que l'apparition de mutants résistants à l'ampicilline n'était pas possible en l'absence de la PLP5, de la PLP1b et de sa lipoprotéine associée, LpoB. De plus, il a été démontré que l'activité GTase et non l'activité TPase de la PLP1b était nécessaire pour l'activation du mécanisme de résistance. Le modèle proposé suggère donc que la PLP1b synthétise de nouvelles chaînes glycanes, que les tiges pentapeptidiques sont ensuite converties en tiges térapeptidiques par la PLP5, et que ces tiges térapeptidiques sont utilisées comme substrats de YcbB qui relie les chaînes glycanes entre elle en formant des ponts entre les tiges peptidiques.

La comparaison des mécanismes de résistance aux β -lactamines par le contournement des PLP par les LDT chez *E. faecium* et *E. coli* permet de relever plusieurs différences majeures. Chez *E. faecium*, Ldt_m est produite de façon constitutive en quantité suffisante pour conférer une résistance, alors que YcbB a besoin d'être surproduite chez *E. coli*. À l'inverse, pour fournir les substrats térapeptidiques de LDT, *E. faecium* a besoin de surproduire la D,D-carboxypeptidase cytoplasmique DdcY, alors que *E. coli* utilise la D,D-carboxypeptidase périplasmique PLP5 constitutivement produite en quantité suffisante. Enfin, les deux espèces ont besoin du déclenchement d'évènements complémentaires pour l'activation du mécanisme de résistance : une hyperphosphorylation des protéines chez *E. faecium* et une hyperproduction de l'alarmone (p)ppGpp chez *E. coli*. La résistance aux β -lactamines médiée par le contournement des PLP par les LDT est donc possible dans des espèces aussi éloignées que *E. faecium* et *E. coli*, suggérant qu'un tel mécanisme de résistance pourrait également être possible dans d'autres espèces bactériennes.

Diversité des fonctions associées aux LDT

Depuis la première caractérisation d'une LDT dans un mutant de *E. faecium* hautement résistant à l'ampicilline sélectionné *in vitro* (Mainardi *et al.*, 2000), de nombreux membres de la famille des LDT ont été identifiés chez des bactéries à Gram positif, à Gram négatif ainsi que chez des mycobactéries. Le nombre de LDT varie selon les espèces bactériennes, allant d'une seule chez *Neisseria meningitidis* et *H. pylori* à 6 chez *E. coli*, 14 chez *Agrobacterium tumefaciens* et jusqu'à 21 chez *Bradyrhizobium*

japonicum (Aliashkevich and Cava, 2022). Une grande diversité de fonctions a été associée à ces enzymes, classées selon les trois types de réactions catalysées dans les sections suivantes.

Formation des ponts de type 3→3. Un premier groupe de LDT catalyse la formation de ponts de type 3→3 dans le peptidoglycane et comprend des enzymes aux fonctions physiologiques variées. La réaction de L,D-transpeptidation catalysée par ces LDT se déroule en deux étapes (Réaction A sur la Figure 9) :

- (i) Lors de la première étape, la cystéine catalytique attaque la liaison peptidique entre le troisième résidu et la D-Ala⁴ d'un donneur d'acyle térapeptidique, ce qui aboutit à la formation d'une liaison thioester. La formation de cet adduit covalent, appelé acyl-enzyme, s'accompagne de la libération de la D-Ala⁴.
- (ii) La liaison thioester de l'acyl-enzyme est ensuite attaquée par le groupement amine porté par la chaîne latérale du troisième résidu de la tige peptidique acceptrice d'acyle. Cette réaction aboutit à la libération de l'enzyme et à la formation d'un pont peptidique de type 3→3, reliant les résidus en position 3 du donneur d'acyle et de l'accepteur d'acyle.

Chez *E. coli*, cette fonction est assurée par deux LDT appelées YcbB et YnhG (renommées ensuite LdtD et LdtE, respectivement) (Magnet *et al.*, 2008).

YcbB est sous le contrôle du régulateur transcriptionnel CpxA/R du système à deux composants de réponse à des stress de l'enveloppe Cpx (Delhaye *et al.*, 2016). Les stress de l'enveloppe, comme des protéines mal repliées dans le périplasme 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 *et al.*, 2019). L'activation de CpxR augmente le niveau d'expression de *ycbB* et la quantité de ponts de type 3→3 dans le peptidoglycane. YnhG est sous le contrôle d'un promoteur reconnu par le facteur σ^S (σ^{38} , encodé par le gène *rpoS*) (Battesti *et al.*, 2011). σ^S 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.

YcbB et YnhG ne sont pas essentielles pour la croissance de *E. coli* en laboratoire et leur absence n'impacte pas la survie en phase stationnaire, dans des conditions de 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 le sujet de nombreuses études, et plusieurs d'entre elles tendent à leur attribuer une fonction dans le contrôle de la taille des ouvertures dans le réseau du peptidoglycane. YnhG pourrait ainsi jouer un rôle dans le contrôle de la taille de ces ouvertures en phase stationnaire, en adéquation avec sa régulation dépendante de σ^S . YcbB pourrait permettre de combler ces ouvertures en réponse à un stress de l'enveloppe lorsque les machineries multiprotéiques se désassemblent, en adéquation avec sa régulation dépendante de CpxA/R. Cette hypothèse a été renforcée par une étude récente assignant un rôle à 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→3 dans le peptidoglycane. La déplétion en LptC entraîne l'arrêt de la croissance bactérienne, et la présence de YcbB est nécessaire pour empêcher la lyse des cellules. Les auteurs ont démontré que ce système de « sauvetage » de la lyse bactérienne par YcbB, induite par un défaut de synthèse des LPS, nécessite l'activité D,D-carboxypeptidase de la PLP6a, l'activité glycosyltransférase de la PLP1b ainsi que sa lipoprotéine associée LpoB.

Chez *Salmonella enterica* serovar Typhi, une étude a démontré qu'une LDT jouait un rôle clé dans la sécrétion de la toxine typhoïde, facteur de virulence essentiel (Geiger *et al.*, 2018). La toxine est produite dans le cytoplasme, exportée vers le périplasma et excrétée dans le milieu extérieur. Les auteurs ont montré que la toxine devait passer à travers le peptidoglycane pour atteindre la membrane externe, d'où elle peut alors être excrétée. Le passage de la toxine à travers le peptidoglycane fait intervenir la LDT YcbB (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 du peptidoglycane 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. Ce rôle pourrait être conservé dans d'autres espèces et étendu à d'autres membres de la famille des LDT.

Les LDT sont également particulièrement importantes chez les bactéries du genre *Mycobacterium*. Le peptidoglycane des mycobactéries pathogènes *M. tuberculosis* et *M. abscessus* et de la mycobactérie modèle non pathogène *Mycobacterium smegmatis* est majoritairement réticulé par des ponts de type 3→3 (60 à 80 % de la totalité des ponts) (Lavollay *et al.*, 2011, 2008; Rimal *et al.*, 2022). Cinq LDT ont été identifiées chez *M. tuberculosis* et chez *M. abscessus* (Ldt_{Mt1} à Ldt_{Mt5} et Ldt_{Mab1} à Ldt_{Mab5}, respectivement), et six chez *M. smegmatis* (LdtABCEFG). Un modèle de synthèse et de maturation du peptidoglycane chez les mycobactéries a récemment été proposé (Baranowski *et al.*, 2018; García-Heredia *et al.*, 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 bourgeonnements sur la paroi latérale, suivie de la lyse d'une partie de la population bactérienne. L'endopeptidase DacB2 coupe les ponts de type 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.

Ldt_{Mt2} est quant à elle nécessaire à la pathogénicité de *M. tuberculosis*. L'infection de souris avec un mutant de *M. tuberculosis* Δ ldt_{Mt2} n'entraîne aucune mortalité jusqu'à 300 jours post-infection, contre

100 % de mortalité à 150 jours avec la souche sauvage. Enfin, l'absence des LDT de *M. smegmatis* et l'absence de Ldt_{M1} et Ldt_{M2} de *M. tuberculosis* entraînent une augmentation de la sensibilité aux β -lactamines (Schoonmaker *et al.*, 2014). 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 PLP et les LDT, sont des antibiotiques efficaces *in vivo* contre *M. tuberculosis* en association avec l'ampicilline et l'acide clavulanique (Hugonnet *et al.*, 2009; Diacon *et al.*, 2016).

Formation d'un lien covalent entre le peptidoglycane et la membrane externe. Un deuxième groupe de LDT est spécialisé dans l'ancrage covalent des protéines au peptidoglycane (Réaction **B** sur la Figure 9).

Chez *E. coli*, trois LDT appelées ErfK, Ybis et YcfS (aussi appelées LdtA, LdtB et LdtC, respectivement) ancrent la lipoprotéine de Braun, également appelée Lpp, au peptidoglycane (Braun and Wolff, 1970; Magnet *et al.*, 2007). La lipoprotéine de Braun est un composant spécifique de l'enveloppe de la plupart des bactéries à Gram négatif. Insérée par sa partie lipidique dans la couche interne de la membrane externe, elle joue un rôle important dans la stabilisation de la paroi bactérienne. La réaction catalysée par ces LDT est la même que pour la formation des ponts de type 3→3, sauf pour la deuxième étape où la Lpp endosse le rôle d'acceptrice d'acyle (Figure 9). Le groupement amine de la lysine C-terminale de la Lpp attaque l'acyl-enzyme, permettant ainsi la formation d'un lien covalent entre le peptidoglycane et la membrane externe [pour une revue sur la fixation covalente des protéines au peptidoglycane, voir (Dramsi *et al.*, 2008)]. ErfK, Ybis et YcfS jouent par conséquent un rôle important dans la stabilité de l'enveloppe en assurant le seul lien covalent entre le peptidoglycane et la membrane externe. Il a été démontré que leur absence déstabilisait la membrane externe (Sanders and Pavelka, 2013).

Certaines espèces bactériennes comme *Coxiella burnetii*, *A. tumefaciens*, *Legionella pneumophila*, ou encore *Brucella abortus* n'ont pas d'orthologues de la Lpp. Chez ces bactéries, il a été démontré que plusieurs protéines β -barrel de la membrane externe sont liées de manière covalente au peptidoglycane (Godessart *et al.*, 2020; Sandoz *et al.*, 2021). Chez le pathogène intracellulaire *C. burnetii*, une des dix LDT identifiées est impliquée dans l'ancrage de ces protéines β -barrel appelées BbpA et BbpB au peptidoglycane, ce qui stabilise la membrane externe de cette bactérie pendant la phase stationnaire de croissance (Sandoz *et al.*, 2021).

Hydrolyse de la liaison entre le peptidoglycane et la Lpp. Un troisième groupe de LDT comprend des enzymes agissant comme des hydrolases (réaction **C** sur la Figure 9).

Chez *E. coli*, la sixième LDT appelée YafK (aussi appelée LdtF, puis DpaA) possède aussi un domaine YkuD qui la classe parmi les LDT bien que son activité L,D-transpeptidase n'ait jamais été démontrée *in vivo* ou *in vitro*. Deux études récentes ont finalement montré que YafK ne possède pas

d'activité L,D-transpeptidase mais est une amidase particulière qui coupe la liaison formée par ErfK, YbiS ou YcfS reliant une tige tripeptidique à la Lpp (Bahadur *et al.*, 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 mécollinam. Ce rôle d'hydrolase n'a pour le moment pas été attribué à d'autres membres de la famille des LDT chez d'autres espèces bactériennes. Dans une autre étude plus ancienne, le criblage d'une bibliothèque de mutants obtenus par insertion aléatoire de transposons avait permis de montrer il y a plusieurs années que YafK était nécessaire à la formation de biofilms par une souche entéro-agrégative de *E. coli* (Sheikh *et al.*, 2001).

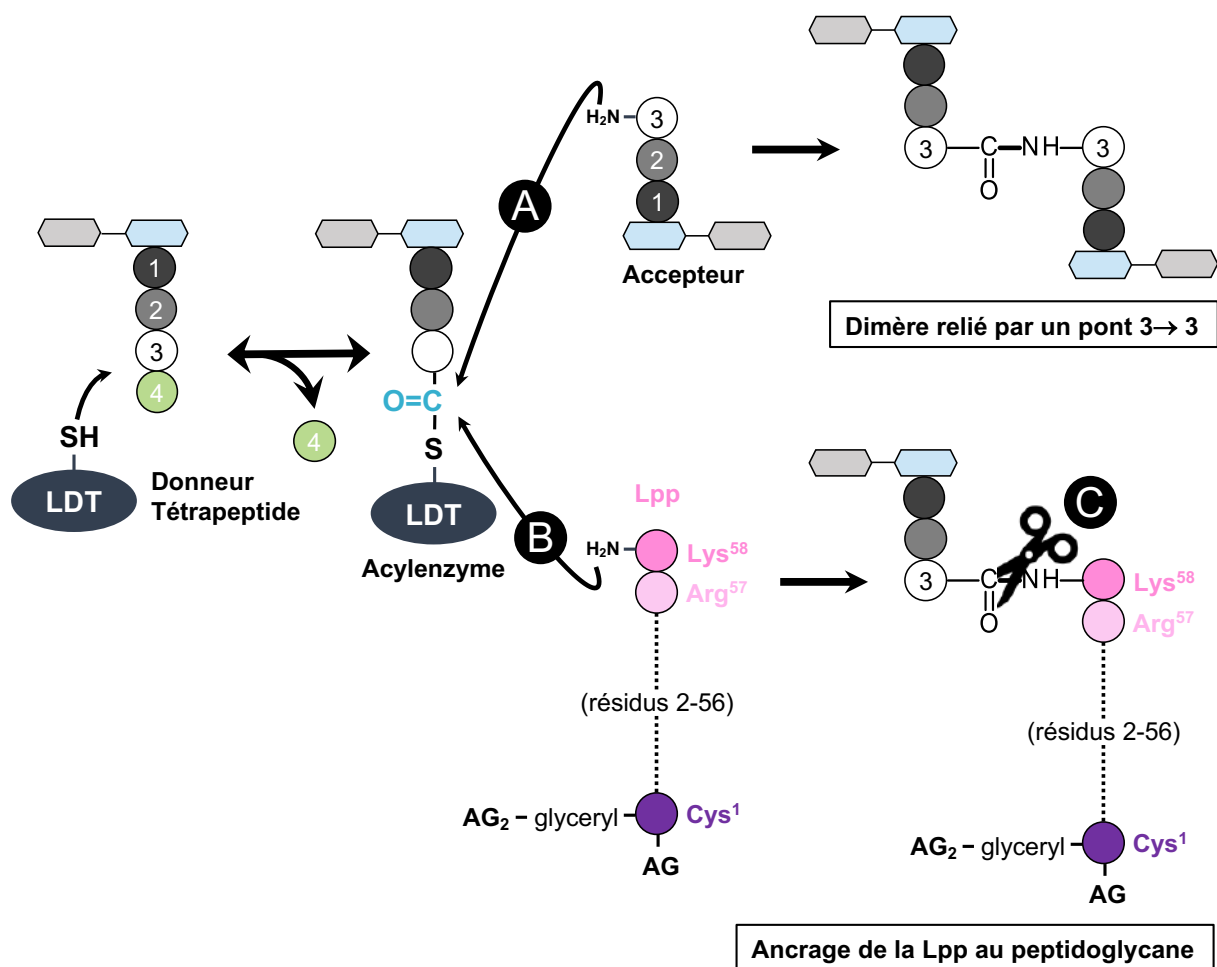


Figure 9. Trois grands types de réactions catalysées par les LDT.

L'attaque nucléophile de la cystéine catalytique de la LDT sur la liaison amide reliant le troisième et le quatrième résidu d'une tige donneuse d'acyle térapeptidique entraîne la formation d'un acyl-enzyme et la libération de la D-Ala⁴. Deux cas de figure sont représentés ici pour la deuxième étape : en haut (réaction A), le groupement amine du résidu en position 3 d'une tige acceptrice attaque la liaison thioester de l'acyl-enzyme pour former un dimère relié par un pont de type 3→3 ; en bas (réaction B), le groupement amine de la lysine C-terminale de la Lpp peut attaquer la liaison thioester de l'acyl-enzyme et ancrer la Lpp au peptidoglycane. D'autres membres de la famille LDT peuvent hydrolyser la liaison amide tripeptide→Lpp (réaction C). Lpp, lipoprotéine ; AG, acide gras.

En plus des trois grands types de réactions présentées dans les sections précédentes, certaines LDT peuvent catalyser l'échange de la D-Ala⁴ terminale des tiges térapeptidiques par la glycine et divers acides aminés de conformation D (par exemple la D-Met) et D-2-hydroxy (par exemple le D-lactate) (Mainardi *et al.*, 2005). Cette réaction d'échange aboutit à l'incorporation d'acides aminés de conformation D dans le peptidoglycane, ce qui entraîne des effets toxiques. C'est le cas chez *Vibrio cholerae*, où LdtA catalyse la formation de ponts de type 3→3 et LdtB catalyse l'ancrage de la Lpp au peptidoglycane. LdtA et LdtB sont également capables de remplacer la D-Ala⁴ par un acide aminé de conformation D dit « non-classique » (Cava *et al.*, 2011). Les auteurs de l'étude ont montré que ces LDT pouvaient spécifiquement remplacer la D-Ala⁴ par un résidu D-Met⁴. La D-Met est synthétisé dans le périplasme à partir de L-Met sous l'action de 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 qui 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*.

Enfin, une autre étude chez *Acinetobacter baumannii* a identifié un membre hydrolytique de la famille des LDT appelé ElsL jouant un rôle clé dans le recyclage du peptidoglycane (Dai *et al.*, 2021). L'absence de ElsL est associée à un certain nombre de phénotypes (perte de la forme des cellules, altération de la croissance, hypersensibilité aux antibiotiques ciblant la paroi cellulaire septale, augmentation de la proportion de ponts de type 3→3 et réduction de la réticulation globale). La plupart de ces phénotypes sont aggravés par l'inactivation de l'enzyme nécessaire à la formation des ponts de type 3→3 (Ldt_{Ab}) ou dans des conditions de faible osmolarité, tandis qu'ils ne sont plus observés lors du blocage du recyclage des muuropeptides. Les auteurs ont proposé un modèle pour expliquer ces observations. ElsL agirait comme une L,D-carboxypeptidase cytosolique qui coupe la D-Ala⁴ des tiges térapeptidiques provenant du turnover de *A. baumannii*. Les phénotypes toxiques du mutant $\Delta elsL$ seraient causés par l'accumulation de térapeptides délétères en l'absence de ce traitement. Lorsqu'ils sont incorporés dans le peptidoglycane en croissance, ces térapeptides ne peuvent pas être utilisés comme donneurs dans la formation de ponts de type 4→3 par les PLP qui utilisent des tiges pentapeptidiques. Les LDT peuvent utiliser les tiges térapeptidiques, ce qui atténue probablement les effets toxiques des térapeptides et explique l'aggravation de la létalité du double mutant $\Delta elsL \Delta ldt_{Ab}$.

4. Turnover et recyclage

Le peptidoglycane n'est pas une structure figée. Il s'agit au contraire d'une structure dynamique qui subit de nombreuses modifications finement régulées tout au long du cycle cellulaire. Une hydrolyse du peptidoglycane conduisant au relargage de nouvelles sous-unités est nécessaire pour introduire des

nouveaux disaccharides-peptides dans le polymère en croissance. Ces modifications sont effectuées par différents types d'hydrolases :

- le clivage des liaisons glycosidiques entre deux sous-unités est assuré par les glucosaminidases (coupure des liaisons β -1 \rightarrow 4 entre GlcNAc et MurNAc) et les muramidases (coupure des liaisons β -1 \rightarrow 4, cette fois-ci entre MurNAc et GlcNAc), incluant les transglycosylases lytiques (TL) ;
- le clivage de la liaison entre le MurNAc et la tige peptidique d'un disaccharide-peptide est catalysé par des amidases ;
- le clivage des liaisons amides est assuré par plusieurs enzymes, en particulier des « endopeptidases » qui clivent les liaisons formées par les transpeptidases et les carboxypeptidases qui coupent le résidu en position C-terminal des tiges peptidiques. Il existe également des « endopeptidases » spécifiques de chacune des liaisons des tiges peptidiques.

Les sous-unités de peptidoglycane peuvent emprunter deux voies distinctes et sont soit relarguées dans le milieu extracellulaire soit réimportées dans le cytoplasme. Le « turnover », comme défini par Johnson *et al.*, correspond au relargage de fragments de peptidoglycane par la cellule. Le transport des fragments de peptidoglycane vers l'intérieur de la cellule en vue de leur réutilisation est appelé recyclage (Johnson *et al.*, 2013).

Le recyclage du peptidoglycane a accidentellement été découvert par Goodell et Schwarz en 1985 lors d'une étude sur le « turnover ». À l'époque, des travaux avaient déjà mis en évidence la perte de mucopeptides, et donc le renouvellement du peptidoglycane, chez des bacilles à Gram positif tels que *B. subtilis* et *Lactobacillus acidophilus*, et des bactéries à Gram négatif comme *Neisseria gonorrhoeae*. Lorsque Goodell et Schwarz ont réexaminé ce phénomène en utilisant du DAP radioactif chez *E. coli*, ils ont noté une perte de 6 à 8 % de DAP dans le milieu de culture par génération. De plus, l'étude des fragments contenant du DAP marqué dans le cytoplasme leur a permis de montrer qu'une grande partie du DAP présent dans la paroi cellulaire était recyclée (Goodell and Schwarz, 1985). À partir des données de cette expérience, Goodell a calculé qu'environ 45 % du peptidoglycane était recyclé par génération, quand 6 à 8 % était libéré à l'extérieur de la cellule bactérienne (Goodell, 1985).

Lors de la première étape du remaniement du peptidoglycane, les transglycosylases lytiques, telles que la protéine soluble Slt70 chez *E. coli*, coupent la liaison β 1 \rightarrow 4 entre le MurNAc et le GlcNAc (Johnson *et al.*, 2013). Lors de cette coupure, les TL catalysent également la formation d'une liaison intramoléculaire 1,6-anhydro entre le C1 et le C6 du MurNAc. Les TL libèrent donc dans le périplasme des GlcNAc-MurNAc^{Anh}-peptides qui peuvent être importés dans le cytoplasme par la perméase AmpG pour être recyclés. Une fois dans le cytoplasme, le résidu GlcNAc de ces anhydro-muropeptides est clivé par l'enzyme NagZ. Le MurNAc^{Anh}-peptide libéré est le substrat de l'amidase AmpD, qui coupe la

liaison entre le tétrapeptide et le MurNac^{Anh}. Pour la partie peptidique, l'hydrolyse de la D-Ala en position 4 du tétrapeptide par la L,D-carboxypeptidase LdcA permet de générer un tripeptide. Ce tripeptide peut alors être transféré en bloc sur l'UDP-MurNac par la Mur ligase Mpl et ainsi réintégrer la voie de biosynthèse du peptidoglycane. Pour les monosaccharides, les enzymes AnmK, MurQ et NagA permettent de convertir le MurNac^{Anh} en glucosamine-6-phosphate (GlcN-6-P). Une partie du GlcN-6-P ainsi formé peut réintégrer la voie de biosynthèse du peptidoglycane au niveau de la réaction catalysée par GlmM, impliquée dans les premières étapes de la biosynthèse du peptidoglycane décrites précédemment.

Le recyclage, qui permet de capter et de réutiliser les fragments de peptidoglycane libérés, permet aux bactéries de limiter le coût énergétique lié au remodelage de leur peptidoglycane mais également de limiter la présence de fragments de peptidoglycane dans le milieu extracellulaire, qui sont susceptibles d'être reconnus par les systèmes de défense des hôtes infectés.

5. Antibiotiques ciblant la synthèse du peptidoglycane

Le peptidoglycane est un composant essentiel et spécifique de la paroi de la plupart des cellules bactériennes. Sa voie de biosynthèse est donc une cible privilégiée pour le développement d'antibiotiques.

La fosfomycine et la D-cyclosérine sont des antibiotiques naturels qui ciblent la synthèse des précurseurs du peptidoglycane (Barreteau *et al.*, 2008). La fosfomycine cible MurA, la première enzyme de la voie de biosynthèse du peptidoglycane, qui catalyse la formation d'UDP-GlcNAc-énolpyruvate, précurseur de l'UDP-MurNac. La D-cyclosérine agit comme un inhibiteur compétitif de deux enzymes, Alr et Ddl, qui catalysent respectivement la formation de D-Ala par racémisation de L-Ala et la condensation de deux molécules de D-Ala pour former un dipeptide (Prosser and de Carvalho, 2013).

La formation du précurseur lipidique est ciblée par la bacitracine, un mélange de polypeptides cycliques naturels, qui séquestre le transporteur lipidique undécaprényl pyrophosphate (C₅₅-PP) et empêche ainsi sa déphosphorylation en undécaprényl phosphate (C₅₅-P) (Stone and Strominger, 1971). Le lipide II peut également être séquestré par un certain nombre d'antibiotiques. Les glycopeptides, comme la vancomycine, se lient à l'extrémité terminale D-Ala⁴-D-Ala⁵ de la tige pentapeptidique du lipide II, inhibant ainsi les étapes de transglycosylation et de transpeptidation (Kahne *et al.*, 2005). La nisine, un antibiotique, a un double mode d'action puisqu'elle se lie à la fraction pyrophosphate du lipide II et qu'elle cible les molécules de lipide II pour former des pores dans la membrane cytoplasmique (Hsu

et al., 2004). La ramoplanine est un glyco-depsipeptide cyclique, qui se lie à la partie pyrophosphate et au MurNAc du lipide II (Hamburger *et al.*, 2009).

La moénomycine inhibe la polymérisation des brins glycanes mais n'est pas utilisée en clinique en raison de ses mauvaises propriétés pharmacocinétiques (Ostash and Walker, 2010).

Les β -lactamines inactivent les transpeptidases responsables de la réticulation des chaînes glycanes. Ces antibiotiques sont décrits dans le chapitre suivant.

III. Les β -lactamines

1. Découverte

Les antibiotiques les plus fréquemment utilisés dans le traitement des infections bactériennes appartiennent à la famille des β -lactamines [pour une revue, voir (Lima *et al.*, 2020)]. La première β -lactamine a été identifiée par Alexander Fleming au début du siècle dernier. En 1928, il observe que certaines boîtes de pétri oubliées dans son laboratoire au début de l'été et inoculées avec des staphylocoques sont contaminées par un champignon appelé *Penicillium notatum*. Il remarque également un halo transparent autour de la moisissure, indiquant une lyse des bactéries inoculées. Trente-deux ans auparavant, le jeune médecin militaire français Ernest Duchesne avait déjà identifié un antagonisme entre les moisissures de *Penicillium glaucum* et les bactéries. Dans sa thèse de médecine datant de 1897, il expliquait avoir inoculé à des cobayes des cultures de microbes pathogènes simultanément avec des cultures de moisissures, et avait établi que ces moisissures de *Penicillium glaucum* pouvaient neutraliser la prolifération des bactéries, empêcher le développement d'infections bactériennes et assurer la survie des cobayes. Ses recherches ne furent cependant pas poursuivies malgré ses souhaits et sa clairvoyance quant aux applications thérapeutiques possibles. Les constatations d'Alexander Fleming ne sont donc pas totalement nouvelles, et il n'arrive pas à extraire la substance responsable des effets observés. Il publie en 1932 les résultats complets de ses travaux. Howard Florey et Ernst Boris Chain saisissent leur importance et réussissent à isoler en 1940 la substance responsable de la lyse des bactéries en très petite quantité. Ce nouvel antimicrobien, appelé « pénicilline » en référence au genre *Penicillium*, montre une efficacité remarquable sur le pneumocoque chez la souris et les premiers essais sur l'homme sont concluants. La pénicilline est cependant difficile à isoler et à produire, et les médecins disposent de trop petites quantités pour que son usage se répande. La Grande-Bretagne est alors en guerre et ne peut fournir un effort de recherche suffisant. Howard Florey se tourne donc vers les États-Unis, où une nouvelle levure est isolée. Appelée *Penicillium chrysogenum*, elle produit deux cent fois plus de pénicilline que la levure de Fleming. La production industrielle est confiée à plusieurs grands laboratoires pharmaceutiques et en 1941, les laboratoires Pfizer parviennent à

produire la pénicilline en grandes quantités. Elle fait son entrée massive en Europe à la faveur du débarquement en Normandie et devient l'antibiotique majeur, rapidement suivie par d'autres antibiotiques découverts après la guerre. La structure chimique de la pénicilline a été élucidée en 1943 par Robert Robinson (Figure 10). Le mode d'action des β -lactamines a été décrit environ quarante ans après la découverte de la pénicilline (Park and Strominger, 1957; Tipper and Strominger, 1965; Wise and Park, 1965).

Fleming, Florey et Chain ont reçu le prix Nobel de médecine en 1945 pour leurs travaux sur la pénicilline. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que les antibiotiques ont accru la durée de vie dans les pays occidentaux de plus de dix ans.

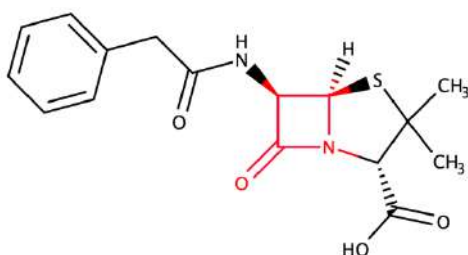


Figure 10. Structure de la pénicilline G.

Le noyau β -lactame commun à toutes les β -lactamines est coloré en rouge.

2. Mode d'action

Les β -lactamines sont des inhibiteurs suicides des Protéines de Liaison à la Pénicilline (PLP) essentielles à la survie des bactéries. Les β -lactamines se substituent au substrat naturel des PLP et forment un acyl-enzyme stable entre le groupement carbonyle de leur noyau β -lactame et la sérine catalytique des PLP. La réactivité des β -lactamines avec les PLP provient en partie de leur ressemblance structurale avec l'extrémité D-Ala⁴-D-Ala⁵ des tiges pentapeptidiques du peptidoglycane (Figure 11).

Contrairement à la réaction entre les PLP et leur substrat naturel dans laquelle l'enzyme est libérée lors de la dernière étape, l'acylation de la sérine du site actif des PLP par les β -lactamines est stable, ce qui entraîne l'inactivation de l'enzyme et, par une cascade d'événements encore mal comprise, la lyse cellulaire.

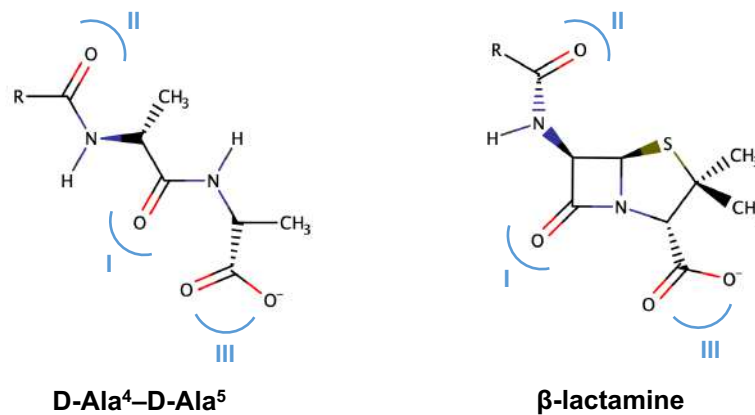


Figure 11. Analogie structurale entre le substrat naturel des PLP et les β-lactamines.

Bien que l'extrémité D-Ala⁴-D-Ala⁵ du substrat pentapeptidique des PLP et les β-lactamines aient une structure générale commune, leur analogie réside dans une distribution similaire des électrons aux positions I, II, et III (colorées en bleu).

3. Classification

Toutes les β-lactamines possèdent un cycle azétidine-2-one (hétérocycle azoté à quatre atomes, substitué d'un groupement carbonyle), nommé plus simplement cycle ou noyau β-lactame. Les β-lactamines sont subdivisées en plusieurs classes définies en fonction de la nature du cycle accolé au noyau β-lactame (Tableau 3). La famille des β-lactamines comprend également des inhibiteurs de β-lactamases, utilisés en association avec les autres classes de β-lactamines pour cibler les bactéries productrices de β-lactamases [pour une revue sur les β-lactamines et les inhibiteurs de β-lactamases, voir (Bush and Bradford, 2016)].

Les pénames, ou pénicillines, proviennent initialement de champignons unicellulaires du genre *Penicillium*. Elles possèdent un noyau péname constitué d'un cycle thiazolidine fusionné au cycle β-lactame. Ce cycle saturé est composé de cinq atomes dont un atome de soufre en position 4. Les pénames sont souvent obtenus par hémisynthèse à partir de l'acide 6-aminopénicillique (6-APA, R= -NH₂ dans la structure du péname présentée dans le Tableau 3). L'introduction de chaînes latérales variées dans le 6-APA a permis d'améliorer la disponibilité orale, d'étendre le spectre antimicrobien aux bactéries à Gram négatif, et d'augmenter la stabilité face aux β-lactamases. L'ampicilline, l'amoxicilline, la méticilline et le mécillinam sont des représentants des pénicillines obtenus par hémisynthèse.

Les céphèmes, également appelés céphalosporines, ont un noyau dihydrothiazine fusionné au noyau β-lactame. Ce noyau possède une insaturation en position C2-C3 ainsi qu'un soufre en position 5. Les céphalosporines sont les β-lactamines les plus abondantes et les plus utilisées en thérapeutique. On

compte cinq générations de céphalosporines, classées en fonction de leur spectre d'activité et de leur date de commercialisation. La ceftriaxone et le céfsulodine sont deux représentants des céphalosporines de 3^{ème} génération obtenus par hémisynthèse.

Les carbapénèmes diffèrent des pénèmes et des céphèmes par la présence d'un cycle pyrroline (ou azoline) fusionné au cycle β -lactame. Ce cycle composé de cinq atomes est monoinsaturé en position C2-C3 et est dépourvu de soufre, contrairement aux pénèmes et aux céphèmes. La liaison entre le C5 et le C6 du noyau β -lactame des carbapénèmes possède une configuration *trans* alors que celle des pénèmes et des céphèmes possède une configuration *cis*. Les carbapénèmes présentent des concentrations minimales inhibitrices (CMI) très 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 voie intraveineuse en font des antibiotiques de dernier recours. L'imipénème et le méropénème sont des représentants des carbapénèmes obtenus par hémisynthèse.

Les pénèmes comportent un atome de soufre en quatrième position, comme les pénèmes, et une insaturation en position C2-C3, comme les carbapénèmes. Le faropénème est un représentant de la classe des pénèmes obtenu par synthèse chimique. Contrairement aux carbapénèmes, le faropénème peut être administré par voie orale (Schurek et al., 2007).

Les monobactames ne contiennent qu'un seul cycle, le cycle β -lactame, et ont un spectre antibactérien plus restreint que les autres classes de β -lactames. L'aztréonam est le seul monobactame utilisé en clinique et l'une des rares β -lactamines possédant une cible préférentielle parmi les PLP. Il cible en effet une PLP de classe B, la PLP3, présente au niveau du divisome chez *E. coli*.

La dernière classe de β -lactamines couramment utilisées est la classe des clavames, qui comprend des inhibiteurs de β -lactamases utilisés en association avec une autre β -lactamine dans le traitement des infections dues à des souches productrices de β -lactamases. L'acide clavulanique est le seul représentant naturel des clavames et inhibe de nombreuses β -lactamases de classe A.

Le spectre d'action des β -lactamines est varié. Chez *E. coli* par exemple, le méropénème inhibe efficacement la PLP5 mais n'inhibe pas les PLP de classe A, contrairement à l'ampicilline qui inhibe efficacement les PLP de classe A mais n'inhibe pas la PLP5 (Curtis *et al.*, 1979; Kocaoglu and Carlson, 2015). L'ampicilline, la ceftriaxone et le méropénème sont des β -lactamines à large spectre, mais il existe certaines β -lactamines à spectre très restreint. Toujours chez *E. coli* par exemple, le mécillinam inhibe spécifiquement la PLP2 présente au niveau de l'élongasome, l'aztréonam inhibe spécifiquement la PLP3 présente au niveau du divisome, et la céfsulodine inhibe spécifiquement l'activité D,D-transpeptidase de la PLP1a et de la PLP1b. Ces β -lactamines à spectre restreint sont très utilisées en recherche et permettent d'étudier spécifiquement l'élongation, la division et les contributions relatives des PLP de classes A et B à la synthèse du peptidoglycane (Cho *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2017; Pazos *et al.*, 2020; Atze *et al.*, 2022).

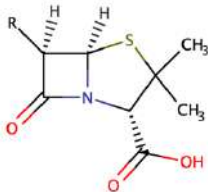
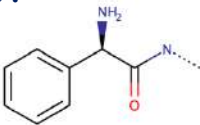

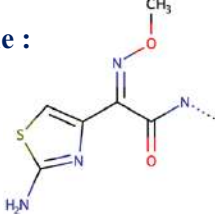
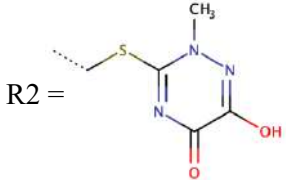
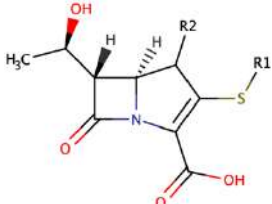
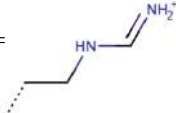
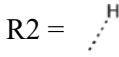
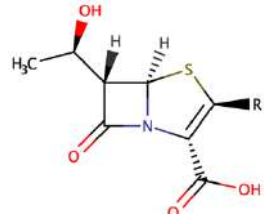

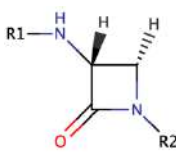
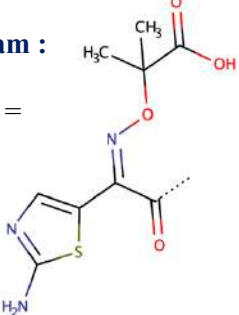
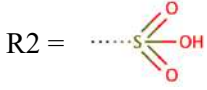

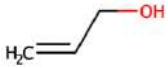
Classes de β -lactamines	Structure	Chaîne latérale d'un représentant de la classe
Pénames		Ampicilline : R = 
Céphèmes		Ceftriaxone : R1 =  R2 = 
Carbapénèmes		Imipénème : R1 =  R2 = 
Pénèmes		Faropénème : R = 
Monobactames		Aztréonam : R1 =  R2 = 
Clavames		Acide clavulanique : R = 

Tableau 3. Structure des classes de β -lactamines et d'un représentant de chaque classe.

4. Mécanismes de résistance

Le développement de la résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel et le produit de milliards d'années d'évolution. Des études sur des micro-organismes provenant de sites vierges, notamment des grottes isolées et du pergélisol, ont montré que la résistance se produisait même en l'absence d'activité humaine (D'Costa *et al.*, 2011). De nombreux antibiotiques utilisés en médecine humaine sont produits par des bactéries qui ont développé des mécanismes de résistance pour éviter l'auto-intoxication par les molécules qu'elles produisent. Les gènes de résistance correspondants pourraient être secondairement acquis par des bactéries qui partagent le même environnement que les bactéries productrices et ultimement transférés aux pathogènes humains. L'utilisation massive des antibiotiques par l'homme a pu favoriser cet échappement des gènes du « résistome » du sol vers les pathogènes humains, comme le montre la présence des mêmes gènes dans les bactéries du sol et les bactéries humaines (Forsberg *et al.*, 2012). À noter que les micro-organismes de l'environnement portaient des gènes codant pour la résistance à des antibiotiques comme la daptomycine avant même leur première utilisation clinique (D'Costa *et al.*, 2012).

Les mécanismes de défense développés par les bactéries pour contrer l'action des β -lactamines sont listés dans les paragraphes qui suivent et résumés dans la Figure 12 [pour une revue, voir (Darby *et al.*, 2022)].

Réduction de la perméabilité de la membrane externe

Chez les bactéries à Gram négatif, les β -lactamines doivent traverser la membrane externe afin de pénétrer dans le périplasme pour atteindre leurs cibles, les PLP. Les β -lactamines sont hydrophiles et traversent la membrane externe en diffusant à travers des porines. Chez la plupart des entérobactéries, les principales porines telles que OmpF et OmpC chez *E. coli*, fonctionnent comme des canaux très peu spécifiques. Des substitutions dans ces porines ou la modification du niveau d'expression des gènes codant pour ces porines entraînent une réduction de la perméabilité de la membrane externe et de la pénétration des β -lactamines.

De nombreuses bactéries à Gram négatif, comme *P. aeruginosa* et *A. baumannii*, ne possèdent pas de porines à larges canaux peu spécifiques. Elles sont au contraire équipées de porines « spécialisées » qui permettent l'entrée de molécules dont la taille n'excède pas 200 Da, ce qui les rend intrinsèquement résistantes à de nombreux antibiotiques (Eren *et al.*, 2012). Leur perte, combinée à d'autres mécanismes, est très souvent associée à un haut niveau de résistance aux carbapénèmes (Ude *et al.*, 2021).

Augmentation de l'efflux

Toujours chez les bactéries à Gram négatif, un autre moyen de diminuer la concentration périplasmique des β -lactamines est la production de pompes à efflux [pour une revue, voir (Du *et al.*, 2018)]. Des mutations dans des gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels entraînent une surproduction de ces pompes, qui transportent activement les β -lactamines du périplasma vers le milieu extérieur. Elles peuvent être spécifiques de certains antibiotiques ou avoir un large spectre et conférer de multiples résistances. Les pompes à efflux à large spectre appartiennent à la superfamille RND (pour « Résistance, Nodulation, Division »). Parmi les exemples bien étudiés, on peut citer les pompes à efflux de la famille RND AcrB chez *E. coli* et MexB chez *P. aeruginosa*. MexB et AcrB sont des homotrimères qui résident dans la membrane interne et forment un complexe tripartite avec une protéine périplasmique, comme AcrA ou MexA, et un canal de la membrane externe, comme TolC ou OprM. 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).

Production de β -lactamases

Le mécanisme de résistance aux β -lactamines le plus couramment rencontré en thérapeutique chez les bactéries à Gram négatif est la production d'enzymes capables d'hydrolyser ces antibiotiques, les β -lactamases [pour une revue sur les β -lactamases, voir (Tooke *et al.*, 2019)]. En se concentrant dans le périplasma, les β -lactamases sont capables d'hydrolyser les β -lactamines avant qu'elles ne rencontrent leurs cibles. Ces enzymes ont évolué dans la nature en réponse à la production de β -lactamines par les micro-organismes et sont étudiées depuis les années 1940. La liste des β -lactamases caractérisées ne cesse de s'allonger, et la *beta-lactamase database* recense actuellement plus de 7000 β -lactamases distinctes (Naas *et al.*, 2017).

Il existe plusieurs classifications des β -lactamases. Celle d'Ambler, la plus couramment utilisée, se base sur la comparaison des séquences protéiques et permet de distinguer quatre classes de β -lactamases (A, B, C et D) (Ambler, 1980). Les β -lactamases de classes A, C et D sont des enzymes qui dégradent les β -lactamines en formant un acyl-enzyme avec leur sérine catalytique. L'acyl-enzyme est ensuite hydrolysé, libérant l'enzyme et inactivant définitivement l'antibiotique. Les β -lactamases de classe B sont des métalloenzymes qui utilisent un ion zinc dans leur site actif pour faciliter l'hydrolyse des β -lactamines. Les β -lactamases peuvent également être classées selon leur capacité à hydrolyser les pénicillines (pénicillinases), les céphalosporines (céphalosporinases) et/ou les carbapénèmes (carbapénémases) (Bush *et al.*, 1995). La combinaison de carbapénémases et de céphalosporinases à large spectre (BLSE pour « β -lactamases à spectre étendu ») a conduit à l'émergence d'isolats cliniques résistants à toutes les β -lactamines (Lynch *et al.*, 2013).

Un grand nombre d'entérobactéries comme *E. coli* et de pathogènes opportunistes à Gram négatif comme *P. aeruginosa* portent des gènes chromosomiques codant pour des β -lactamases de classe C, typiquement annotés *ampC*, qui ne sont pas exprimés dans des conditions normales. Cependant, la dérégulation de ces gènes, soit à la suite d'une mutation, soit par induction par des β -lactamines spécifiques, peut conduire à un haut niveau d'expression des gènes conférant ainsi une résistance aux β -lactamines.

La résistance aux carbapénèmes est particulièrement préoccupante, les carbapénèmes faisant partie des antibiotiques les plus puissants utilisés en thérapeutique. La résistance aux carbapénèmes, associée à la résistance à d'autres β -lactamines, peut exclure l'utilisation de toutes les molécules de la famille des β -lactamines. Les carbapénémases, comme les KPC (classe A), NDM (classe B) et OXA (classe D), ont la capacité d'hydrolyser les pénames, les céphèmes et les carbapénèmes, ce qui réduit considérablement le nombre d'options dans le traitement d'une infection donnée. De nouvelles variantes des carbapénémases sont continuellement découvertes ; KPC-55 est par exemple particulièrement efficace pour hydrolyser l'aztréonam et le méropénème (Yoon *et al.*, 2020), NDM-19 peut hydrolyser les β -lactamines même dans des conditions de faible teneur en zinc (Mancini *et al.*, 2019), et OXA-679 chez *Acinetobacter calcoaceticus* confère un haut niveau de résistance aux carbapénèmes (Tietgen *et al.*, 2019).

Il existe plusieurs inhibiteurs de β -lactamases. Les inhibiteurs de 1^{ère} génération comme l'acide clavulanique (Tableau 3) agissent sur 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^{ème} génération comme l'avibactam ont un motif diazabicyclooctane (DBO) et fonctionnent de façon similaire aux inhibiteurs de 1^{ère} génération, mais inactivent l'enzyme de façon réversible (Ehmann *et al.*, 2012). Les inhibiteurs de 1^{ère} et 2nde génération ne sont cependant pas capables d'inhiber les métallo- β -lactamases de classe B.

Modification des PLP

L'expression de PLP de faible affinité pour les β -lactamines est un mécanisme de résistance souvent rencontré chez les bactéries à Gram positif. La PLP2a de *S. aureus*, la PLP5 de *E. faecium* et la PLP4 de *E. faecalis* sont toutes des PLP de classe B de faible affinité qui ont un niveau d'acylation avec les β -lactamines plus faible que pour les autres PLP de la même classe (Lambert, 2005; Zapun *et al.*, 2008). La surexpression de ces PLP de faible affinité n'est cependant pas suffisante pour conférer la résistance chez les entérocoques, et des substitutions d'acide aminés dans les PLP de classe B sont nécessaires (Klare *et al.*, 1992). La résistance aux β -lactamines par des substitutions dans les PLP est d'ailleurs fréquemment rencontrée. La présence de mutations dans la PLP4 de *P. aeruginosa*, dans la PLP1 de *H.*

pylori, dans la PLP1 de *N. gonorrhoeae* et dans d'autres PLP d'autres espèces a déjà été décrite dans la littérature (Bellido *et al.*, 1990; Okamoto, 2002; Ropp *et al.*, 2002). En plus de simple ou multiples substitutions dans les PLP, des événements de recombinaisons homologues entre espèces proches peuvent entraîner la formation d'allèle mosaïque codant pour des PLP de faible affinité. L'exemple type est la résistance à la pénicilline chez *Streptococcus pneumoniae*, qui est conférée par des gènes mosaïques de PLP codant pour des enzymes peu sensibles à l'inhibition par la pénicilline (Hakenbeck *et al.*, 2012). Ces allèles mosaïques sont apparus par recombinaison avec l'ADN d'une espèce étroitement apparentée, *Streptococcus mitis*.

L,D-transpeptidation

Le dernier mécanisme de résistance aux β -lactamines décrit dans la littérature est le contournement de l'activité D,D-transpeptidase des PLP par l'activité L,D-transpeptidase des LDT (Mainardi *et al.*, 2000; Hugonnet *et al.*, 2016). Ce mécanisme de résistance « artificiel » est décrit en détails dans le chapitre II.3.b (p. 34).

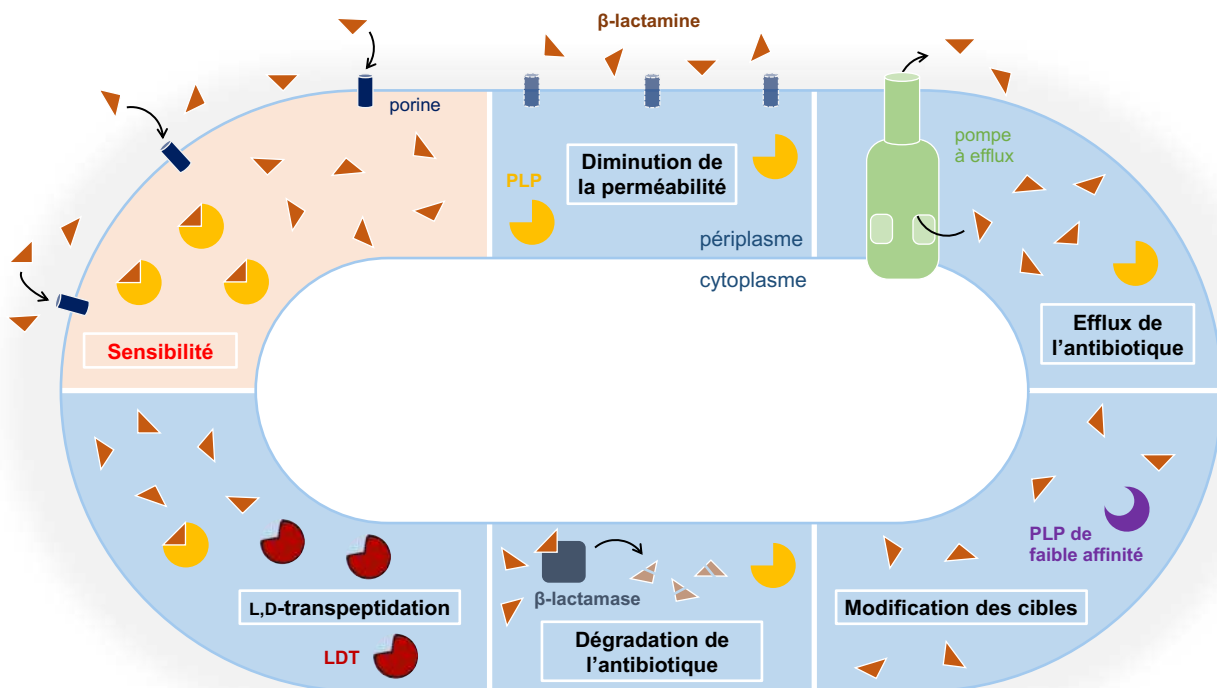


Figure 12. Mécanismes de résistance aux β -lactamines chez les bactéries à Gram négatif.

Les β -lactamines entrent dans le périplasma par les porines de la membrane externe. Les bactéries sensibles (fond orange) sont tuées à cause de l'inhibition des PLP (en jaune) par les β -lactamines (en orange). 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 exprimant des PLP de faible affinité (modification des cibles), en produisant des β -lactamases qui hydrolysent les β -lactamines (dégradation de l'antibiotique), ou encore en contournant les PLP par l'action des LDT (L,D-transpeptidation).

IV. Les biofilms

1. Historique et importance en clinique

Les biofilms sont des communautés de micro-organismes qui se développent en contact avec une surface. L'existence de ce mode de vie a été rapportée pour la première fois en 1933 par Arthur Henrici qui observe, à la surface d'une lame de verre plongée dans un aquarium, un dépôt de microorganismes s'épaississant au cours du temps et formant alors un film bactérien (Henrici, 1933). En 1943, Claude Zobell observe que les bactéries colonisant les parois d'un récipient rempli de liquide sont plus nombreuses que celles en suspension (Zobell, 1943). Au début des années 80, William Costerton rapporte que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixé sur des surfaces et constitue des populations hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire riche en eau, en sucres et en protéines (Costerton *et al.*, 1981). Appelées biofilms, celles-ci sont présentes dans tous les environnements et associées à des surfaces minérales, végétales ou animales. Bien qu'ayant un rôle écologique capital et contribuant très largement au bon fonctionnement de nombreux écosystèmes, les biofilms peuvent être particulièrement néfastes en médecine humaine et vétérinaire ainsi que dans l'industrie. En effet, ces communautés bactériennes ont la particularité de tolérer toutes sortes de stress (dessiccation, carence en nutriments, exposition aux acides, agents antibactériens, etc.) et sont donc très difficiles à éliminer.

En milieu hospitalier, les biofilms colonisent aussi bien les surfaces biotiques (tissus ou muqueuses) qu'abiotiques (prothèses, implants, cathéters ou autres équipements médicaux) (Figure 13). La colonisation bactérienne des muqueuses et des tissus a été mise en évidence pour la première fois dans les années 70 par Niels Høiby [il décrit, entre autres, l'ensemble de ses travaux dans une revue en 2017 (Høiby, 2017)]. Høiby démontre alors le lien entre la présence d'agrégats bactériens et la chronicité d'infections pulmonaires persistantes en examinant au microscope des crachats issus de patients atteints de la mucoviscidose. Dès le début des années 80, le développement de la microscopie électronique a permis d'observer de plus près la colonisation de dispositifs médicaux implantés. Des dépôts bactériens ont ainsi pu être visualisés sur la surface de cathéters intraveineux ou de stimulateurs cardiaques (Locci *et al.*, 1981; Marrie *et al.*, 1982; Christensen *et al.*, 1987). Le *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) estime aujourd'hui que les biofilms sont responsables de plus de 65 % de toutes les infections bactériennes chroniques, tandis que le *National Institutes of Health* (NIH) estime qu'ils sont responsables d'environ 80 % des infections microbiennes et de plus de 60 % des infections nosocomiales (programme annonces [PA-03-047](#) et [PA-06-537](#), disponibles en ligne). Bien que difficiles à évaluer précisément, de telles estimations soulignent l'importance de l'étude des biofilms afin de mieux comprendre leurs spécificités et de les combattre.

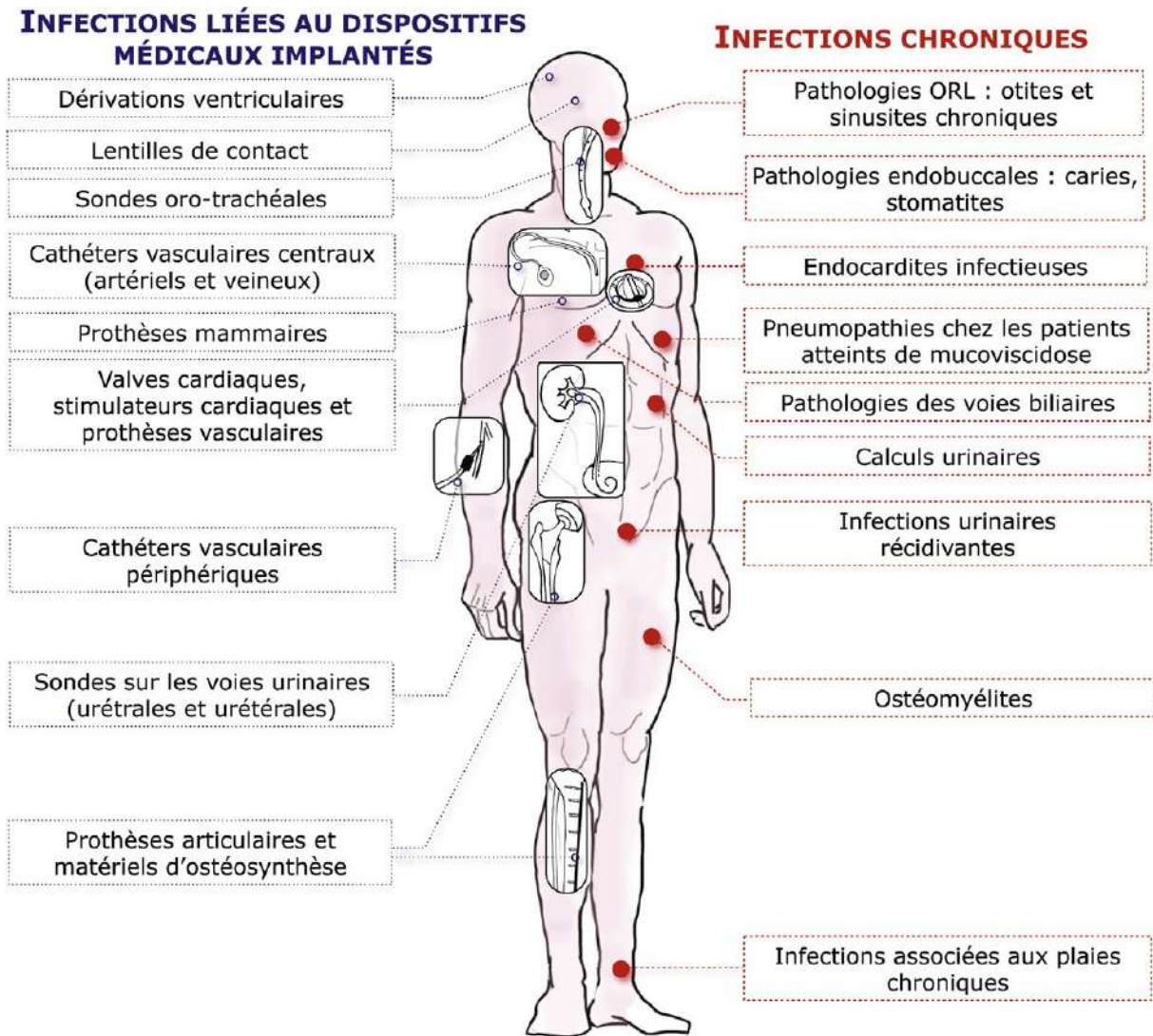


Figure 13. Principales infections associées à la formation de biofilms bactériens.

[Extraite de (Lebeaux *et al.*, 2014)]

Les biofilms sont donc définis comme des agrégats organisés de microorganismes qui se développent en contact avec une surface et enrobés d'une matrice hydratée, riche en polymères extracellulaires, et produite par les bactéries elles-mêmes. La majorité des bactéries sont capables de former des biofilms et les différentes étapes conduisant à la formation d'agrégats complexes et hétérogènes à partir de quelques bactéries individuelles ont été largement décrites pour certaines espèces.

2. Développement

a) Étapes de formation

Adhésion initiale

La transition du mode de vie planctonique à celui de biofilm débute par l'adhésion initiale d'une cellule individuelle à une surface (Figure 14) [pour une revue détaillée sur les mécanismes moléculaires de formation des biofilms de *P. aeruginosa* et *E. coli*, voir (Laverty *et al.*, 2014)]. Cette étape critique est d'abord conditionnée par les caractéristiques physico-chimiques de la surface biotique ou abiotique (hydrophobie et charge électrostatique). Le processus d'adhésion bactérienne repose également sur différentes propriétés bactériennes comme la motilité médiée par les flagelles et la structure de l'enveloppe cellulaire, avec les adhésines protéiques et les polysaccharides associés à la surface. De plus, la di-guanosine monophosphate cyclique (di-GMPc) est un messager secondaire central régulant la transition entre la vie planctonique et l'établissement d'un biofilm. Il s'agit d'une petite molécule diffusible dont la concentration intracellulaire est influencée par de nombreux stimuli environnementaux et qui régule l'expression de gènes impliqués dans la formation de biofilm (production de polysaccharides de la matrice) ou bien impliqués dans le phénotype mobile (production de flagelle) (McDougald *et al.*, 2012). La capacité des bactéries à coloniser une surface est souvent déterminée par une combinaison complexe des facteurs mentionnés précédemment (Beloin *et al.*, 2005).

Maturation

Une fois les bactéries adhérentes à la surface, elles se multiplient, s'agrègent, et forment des microcolonies. Si les conditions du milieu le permettent, le biofilm connaît une phase de maturation et de croissance tridimensionnelle durant laquelle il s'épaissit et produit une matrice extracellulaire. À ce stade, l'incorporation de bactéries d'espèces différentes ou d'autres microorganismes peut mener à la formation de biofilms polymicrobiens ou mixtes (Lebeaux and Ghigo, 2012). En fonction des conditions environnementales, certaines bactéries peuvent se détacher de la structure du biofilm via un processus de dispersion actif ou passif et ainsi coloniser de nouvelles surfaces (McDougald *et al.*, 2012). Les mécanismes de dispersion passive du biofilm font référence à un détachement médié par des forces externes (Choi and Morgenroth, 2003). À l'opposé, la dispersion active est médiée par un changement phénotypique en réponse à des signaux spécifiques détectés par les bactéries. Ces signaux peuvent être produits par les bactéries elles-mêmes, comme c'est le cas pour les acides gras (Davies and Marques, 2009) et l'oxyde nitrique (Barraud *et al.*, 2014), ou déclenchés par des conditions environnementales défavorables comme dans le cas de carences en nutriments (Sauer *et al.*, 2004). Les mécanismes de dispersion reposent alors généralement sur un affaiblissement de la matrice du biofilm. La dispersion

est une étape importante qui contribue à la survie des bactéries et à la transmission de l'infection [pour une revue, voir (Rumbaugh and Sauer, 2020)].

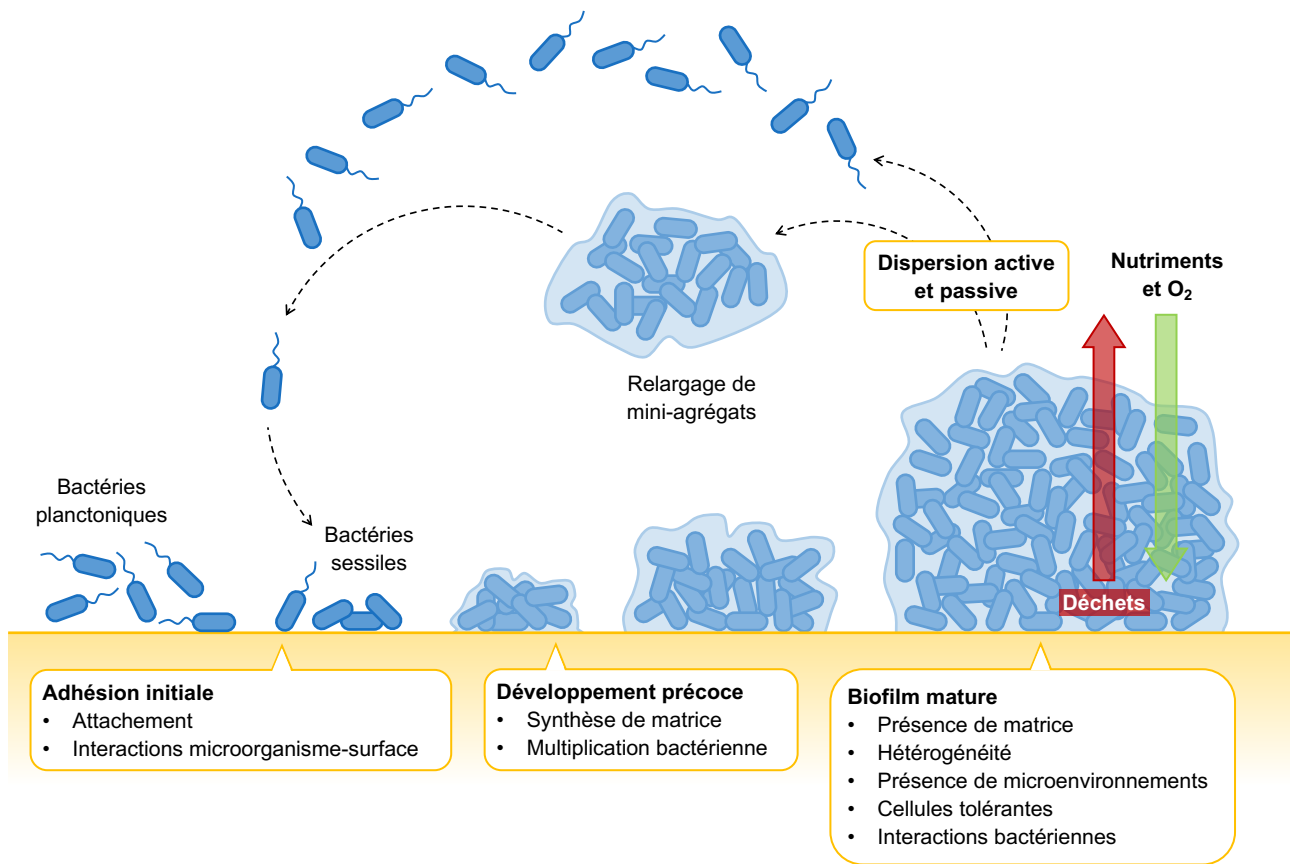


Figure 14. Étapes de formation et structure d'un biofilm bactérien.

Après la phase d'adhésion initiale, les bactéries agrégées sur la surface devenues sessiles forment une microcolonie qui produit une matrice extracellulaire (schématisée en bleu clair). Le biofilm mature est un environnement hétérogène au sein duquel des gradients inverses en nutriments (flèche verte) et en déchets (flèche rouge) définissent des niches caractérisées par des conditions physico-chimiques particulières. La dispersion du biofilm peut impliquer la libération de bactéries mobiles (dispersion active) ou d'agrégats bactériens entourés de matrice (dispersion passive), susceptibles de coloniser d'autres surfaces.

[Adaptée de (Lebeaux and Ghigo, 2012) et (Aumeran *et al.*, 2020)]

b) Diversité et rôles des composants de la matrice

Le mode de vie en biofilm se caractérise par la production d'un matériau extracellulaire gélatineux appelé matrice, qui peut représenter jusqu'à 90 % de la masse sèche totale du biofilm (Flemming and Wingender, 2010). Cette matrice est une structure physique qui sépare les micro-domaines, maintient la proximité des bactéries et sert d'échafaudage pour la structure tridimensionnelle de la communauté microbienne (Lawrence *et al.*, 2007). Elle est composée de diverses substances polymériques

extracellulaires (EPS) dont la composition est variable. Les interactions entre les différentes EPS créent un réseau complexe à l'origine de l'organisation spatiale des amas cellulaires et de la morphologie du biofilm.

Entre autres fonctions, la matrice constitue une barrière protectrice qui préserve les bactéries de l'action des agents antimicrobiens ou de la dessiccation et permet la rétention d'eau et de nutriments à l'intérieur du biofilm. Les premières études se sont d'abord concentrées sur les exopolysaccharides de la matrice et ont démontré leur rôle dans la mise en place de l'architecture du biofilm et le maintien de son intégrité structurelle. Chez *E. coli*, la production de cellulose préserve les bactéries de la dessiccation alors que la production d'acide colanique, qui n'est pas essentiel pour l'adhésion bactérienne, permet la formation de biofilms multicouches (Danese *et al.*, 2000). Il est désormais bien décrit que des protéines, des acides nucléiques et des lipides sont également présents dans la matrice et assurent des fonctions diverses (Tableau 4).

Par exemple, la présence d'ADN extracellulaire dans la matrice du biofilm a été détectée très tôt (Whitchurch *et al.*, 2002), mais on pensait à l'origine qu'il était produit par la lyse cellulaire et sa fonction n'était pas bien comprise. Il est maintenant bien admis que l'ADN extracellulaire est nécessaire à la formation du biofilm chez plusieurs espèces bactériennes telles que *Bacillus cereus* (Vilain *et al.*, 2009) ou *P. aeruginosa* (Whitchurch *et al.*, 2002) où il agit comme une adhésine. En 2015, il a été démontré que l'ADN extracellulaire formait des liaisons ioniques avec l'exopolysaccharide Pel chargé positivement, contribuant ainsi à la stabilité structurelle du biofilm ((Jennings *et al.*, 2015).

Parmi les protéines présentes dans la matrice du biofilm, certaines sont des enzymes extracellulaires qui participent à la dégradation des biopolymères, ce qui permet la dispersion du biofilm ou le recyclage de sources de carbone et d'énergie en cas de carence. D'autres comme les lectines jouent un rôle structurel en créant un lien entre les cellules microbiennes et les composants de la matrice, comme c'est le cas chez *P. aeruginosa* (Tielker *et al.*, 2005).

EPS	Fonction	Intérêt pour les biofilms
Polysaccharides, protéines, ADN et molécules amphiphiles	Adhésion	Premières étapes d'adhésion dans la colonisation de surfaces abiotiques et biotiques par les cellules planctoniques et attachement à long terme des biofilms aux surfaces
Polysaccharides, protéines, ADN	Agrégation des bactéries	Reconnaissance et interaction entre les cellules, immobilisation temporaire des populations bactériennes et développement d'amas denses

Polysaccharides chargés et neutres, protéines (amyloïdes ou lectines) et ADN	Cohésion des bactéries	Stabilité mécanique et architecture du biofilm
Polysaccharides hydrophiles et probablement protéines	Rétention d'eau	Maintien de l'hydratation des microenvironnements autour des bactéries
Polysaccharides et protéines	Barrière protectrice	Ralentissement de la diffusion des molécules antimicrobiennes
Polysaccharides chargés ou hydrophobes et protéines	Sorption de composés organiques	Accumulation de nutriments de l'environnement
Protéines	Activité enzymatique	Digestion de macromolécules exogènes et dégradation de l'EPS structural permettant ainsi le relargage des cellules du biofilm
Potentiellement tous les composés de la matrice	Source de nutriments	Source de composés à base de carbone, d'azote et de phosphore
ADN	Échanges d'informations génétiques	Transfert de gènes horizontal entre les cellules du biofilm, acquisition de gènes de résistance aux biocides ou d'autres caractères bénéfiques augmentant les chances de survie de la communauté
Protéines	Donneur ou accepteur d'électrons	Activité redox dans la matrice du biofilm
Vésicules membranaires contenant des acides nucléiques, enzymes et phospholipides	Export de composants cellulaires	Relargage du matériel cellulaire
Polysaccharides	Stockage d'excès d'énergie	Stockage de l'excès de carbone lorsque l'équilibre carbone-azote est rompu
Polysaccharides et enzymes	Liaison aux enzymes	Accumulation, rétention et stabilisation des enzymes à travers leur interaction avec les polysaccharides

Tableau 4. Fonction des substances polymériques extracellulaires présentes dans la matrice des biofilms bactériens.

[Traduit et adapté de (Flemming and Wingender, 2010)]

L'accumulation de ces différentes molécules dans l'espace extracellulaire, résultant d'une sécrétion active, de la production de vésicules membranaires et de la lyse cellulaire, fait du biofilm un environnement hautement hétérogène (Flemming *et al.*, 2007).

3. Hétérogénéité

a) Physico-chimique

En plus de son organisation spatiale, une caractéristique unique du mode de croissance du biofilm est son hétérogénéité physico-chimique due à la présence de multiples gradients de substrats et de produits métaboliques (Lee *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2013). Contrairement aux conditions de croissance planctoniques, dans lesquelles toutes les bactéries sont en contact avec un milieu de culture homogène, le flux de liquide est réduit dans le biofilm et le transport des nutriments dans la matrice hautement hydratée repose sur une diffusion plus lente (de Beer *et al.*, 1997).

La distribution spatiale des espèces chimiques dans le biofilm a pu être étudiée en utilisant des microcapteurs spécifiques (Stoodley *et al.*, 1994). L'utilisation de microélectrodes a ainsi montré que le niveau d'oxygène diminuait progressivement en s'enfonçant dans le biofilm (de Beer *et al.*, 1994). Cependant, ce modèle de distribution de l'oxygène est trop simplifié, car il ne tient pas compte de l'hétérogénéité de la structure du biofilm. Il a en effet été démontré que l'espace laissé entre les amas denses de cellules dans le biofilm crée des cavités et des canaux qui facilitent le transport des liquides et la distribution de l'oxygène à travers le biofilm. Pourtant, la pénétration de l'oxygène dans les amas cellulaires est toujours limitée par sa vitesse de diffusion, ce qui explique l'établissement de gradients d'oxygène dans le biofilm.

Comme pour l'oxygène, on observe un appauvrissement progressif en nutriments dans les profondeurs du biofilm (Petroff *et al.*, 2011). Les bactéries métaboliquement actives dans les couches supérieures consomment des nutriments et produisent également des déchets métaboliques qui peuvent s'accumuler dans la matrice, créant ainsi des gradients métaboliques. C'est par exemple le cas des petites molécules de signalisation produites dans les biofilms et impliquées dans un mécanisme de communication bactérienne appelé *quorum-sensing* (Papenfort and Bassler, 2016). Alors que leur concentration augmente rapidement en raison d'une vitesse de diffusion lente, elles peuvent atteindre un niveau seuil qui va activer diverses voies de régulation et induire une réponse phénotypique collective. Des phénomènes de complémentarité métabolique ont également été décrites, au cours desquelles une bactérie peut utiliser des nutriments produits par des bactéries voisines. À l'opposé de ces phénomènes coopératifs, les bactéries peuvent entrer en compétition en produisant des molécules qui permettent d'empêcher l'implantation d'un organisme exogène dans le biofilm (Rendueles and Ghigo, 2012).

Par ailleurs, il a également été démontré que le pH au sein du biofilm était variable d'une zone à l'autre. L'accumulation de déchets métaboliques rejetés par les bactéries diminue le pH local de manière

non uniforme dans la structure du biofilm, affectant ainsi l'état physiologique des bactéries (Stewart and Franklin, 2008).

De nombreux antibiotiques sont plus efficaces sur les bactéries se multipliant activement, c'est le cas par exemple pour les β -lactamines. L'accès limité aux nutriments, la faible concentration en oxygène et le pH élevé des couches profondes du biofilm induisent un ralentissement de la croissance bactérienne qui pourrait diminuer l'activité des agents antibactériens (Davies, 2003). Cette hypothèse ne permet cependant pas d'expliquer la tolérance à certains antibiotiques comme les quinolones, actifs sur des bactéries qui ne se divisent pas.

b) Biologique

Dans les milieux naturels, les communautés bactériennes sont souvent constituées de plusieurs espèces (Yang *et al.*, 2011; Burmølle *et al.*, 2014). Un nombre grandissant d'études montre que les biofilms responsables d'infections sont souvent polymicrobiens et que la virulence est aussi régie par des interactions spécifiques entre les espèces bactériennes (Peters *et al.*, 2012; Wolcott *et al.*, 2013). La formation de communautés multi-espèces peut être bénéfique, ces interactions pouvant permettre à des bactéries de se développer dans un environnement défavorable où elles ne peuvent se développer seules. Par ailleurs, la distribution des espèces dans un biofilm n'est pas aléatoire mais plutôt organisée dans l'espace. Bien que *S. aureus* et *P. aeruginosa* soient toutes deux présentes dans des infections de plaies chroniques liées à la formation de biofilm, *P. aeruginosa* trouve sa localisation dans les couches profondes de la plaie (Fazli *et al.*, 2009). D'autres études sont venues appuyer cette observation, permettant d'émettre l'hypothèse que l'organisation spatiale des différents micro-organismes à l'intérieur du biofilm pourrait être directement corrélée à l'hétérogénéité physico-chimique discutée dans les parties précédentes (Brenner and Arnold, 2011; Mark Welch *et al.*, 2016). Par exemple, une diminution de la disponibilité en oxygène dans les couches profondes du biofilm conduit à une stratification des espèces, avec des bactéries aérobies dans les couches supérieures et principalement anaérobies dans les couches inférieures.

4. Tolérance aux agressions extérieures

Les bactéries se développant en biofilm ont la capacité de rester en vie, même lorsqu'elles sont soumises aux conditions physico-chimiques et aux agressions extérieures les plus extrêmes, telles que l'exposition aux ultraviolets, aux métaux lourds, aux acides et aux changements d'hydratation et de salinité (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Elles sont également capables de survivre en présence de très fortes

concentrations d'antibiotiques (Lewis, 2007). On parle d'un phénomène de tolérance du biofilm, qui se distingue de la résistance.

Alors que la résistance peut être définie comme la capacité d'un microorganisme à se multiplier en présence d'un biocide, la tolérance correspond à une inhibition de la croissance des bactéries sans qu'un antibiotique bactéricide soit capable de les tuer au-delà d'un certain point. Les mécanismes de résistance sont nombreux (schématisés dans la Figure 12 pour la résistance aux β -lactamines) et la majorité d'entre eux sont héréditaires, c'est-à-dire transmis de la bactérie mère aux bactéries filles. Ces résistances acquises permettent aux bactéries de continuer à se multiplier même en présence de l'antibiotique. L'analyse de biofilms formés *in vitro* ou *in vivo* et exposés à un antibiotique bactéricide montre qu'une augmentation de la concentration d'antibiotique ou du temps de contact entraîne une diminution du nombre de bactéries survivantes au sein du biofilm, sans jamais atteindre une mortalité de 100 % (Bernier *et al.*, 2013). Cependant, les bactéries survivantes ne se multiplient pas, on parle de ce cas de tolérance (Stewart, 2015). Cette caractéristique est phénotypique, c'est-à-dire qu'elle disparaît lorsque les bactéries composant le biofilm sont remises en suspension, en phase planctonique. Il ne s'agit donc pas de mécanismes de résistance acquis et transmissibles d'une bactérie mère à une bactérie fille. En outre, les mécanismes contribuant à la tolérance des biofilms peuvent s'associer et se renforcer. Différentes hypothèses pouvant les expliquer sont décrites dans les parties suivantes et résumées dans la Figure 15.

a) Diffusion réduite des antibiotiques

Après la découverte de la tolérance des biofilms aux agents antimicrobiens, la matrice extracellulaire les entourant a été la première incriminée, agissant probablement comme une barrière physique pour empêcher la diffusion des antibiotiques à travers le biofilm (Davies, 2003; Stewart, 2003). En effet, de nombreuses études sur des biofilms formés *in vitro* ont permis de démontrer que les propriétés mécaniques et physicochimiques de la matrice extracellulaire pouvaient réduire ou ralentir la diffusion de multiples molécules, y compris les antibiotiques ou les antiseptiques. Les antibiotiques chargés positivement, comme les aminosides par exemple, peuvent être adsorbés par les polymères de la matrice chargés négativement et ainsi mal diffuser (Nichols *et al.*, 1988). L'utilisation de microélectrodes a également permis d'analyser la diffusion d'antiseptiques au travers de la matrice. Il a ainsi été démontré qu'après 2 heures de contact entre un antiseptique chloré et un biofilm mixte composé de *P. aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*, la concentration de l'antiseptique dans les couches profondes du biofilm était 5 fois inférieure à celle du milieu (De Beer *et al.*, 1994).

Cette altération de la diffusion des antibiotiques par la matrice ne peut cependant pas expliquer totalement le phénomène de tolérance du biofilm. En effet, certains biofilms sont tolérants à des antibiotiques qui diffusent pourtant librement au sein de la matrice, comme les fluoroquinolones, la rifampicine et l'ampicilline (Anderl *et al.*, 2000; Zheng and Stewart, 2002; Rodríguez-Martínez *et al.*,

2007). En revanche, le ralentissement de la diffusion des antibiotiques au sein de la matrice peut conduire à exposer transitoirement des bactéries à des concentrations subinhibitrices d'antibiotiques, entraînant une adaptation physiologique permettant aux bactéries du biofilm de survivre. Plusieurs études ont montré que l'exposition de bactéries à des concentrations subinhibitrices d'antibiotiques pouvait favoriser la formation de biofilm, la survenue de mutations conférant une résistance, ainsi que la sélection de mutants résistants (Hoffman *et al.*, 2005; Hughes and Andersson, 2012; Jørgensen *et al.*, 2013).

b) Altération du micro-environnement

La concentration en oxygène décroît à mesure que l'on s'enfonce dans la structure tridimensionnelle biofilm, les nutriments se font plus rares et les déchets du métabolisme bactérien s'accumulent. Les couches profondes du biofilm sont caractérisées par une carence en oxygène et en nutriments, une accumulation de déchets, et un pH acide, ce qui influence la vitesse de croissance des bactéries et constitue des conditions défavorables à l'action de certains antibiotiques. C'est par exemple le cas des β -lactamines, qui sont plus efficaces sur les bactéries se multipliant activement (Tuomanen, 1986). Du fait de la carence nutritionnelle, les bactéries des couches profondes ne se multiplient pas et sont donc peu sensibles à l'action des β -lactamines (Tuomanen *et al.*, 1986; Tanaka *et al.*, 1999). De plus, l'hypoxie et les variations de pH sont défavorables à l'action des aminosides (Baudoux *et al.*, 2006). Cependant, même si ces facteurs jouent un rôle important dans le cas des β -lactamines ou des aminosides, ils ne permettent pas d'expliquer pas la tolérance des biofilms aux antibiotiques actifs contre les bactéries ne se multipliant pas, comme les fluoroquinolones (Ashby *et al.*, 1994).

c) Mécanismes génétiques spécifiques

Le caractère phénotypique, et donc transitoire, de la tolérance des biofilms aux antibiotiques, a incité de nombreuses équipes à rechercher des gènes spécifiquement induits lors de la formation du biofilm. Ceux-ci pourraient induire l'expression de mécanismes capables d'augmenter la capacité d'une bactérie du biofilm à survivre en présence d'antibiotiques. Il a par exemple été démontré que l'inactivation du gène *ndvB* chez *P. aeruginosa* rendait les bactéries du biofilm plus sensibles aux antibiotiques (Mah *et al.*, 2003). Ce gène code pour une enzyme nécessaire à la production de glucanes qui s'accumulent dans le périplasme de *P. aeruginosa* et qui séquestrent les aminosides, empêchant toute interaction avec leur cible intracellulaire. Des pompes d'efflux uniquement exprimées en conditions de biofilm ont également été trouvées chez *E. coli* et *P. aeruginosa*, et permettent l'export d'antibiotiques à l'extérieur de la bactérie afin de réduire leur concentration intracytoplasmique. Chez *P. aeruginosa*, des transporteurs comme MexAB-OprM et MexCD-OprJ permettent l'efflux de l'azithromycine, la colistine et

l'ofloxacin (Brooun *et al.*, 2000; Pamp *et al.*, 2008). Chez *E. coli*, plusieurs pompes ont été identifiées, dont AcrAB-TolC qui participe à l'exportation de composés toxiques pour la bactérie (Kvist *et al.*, 2008). Toujours chez *E. coli*, une carence en nutriments associée à la réponse SOS est à l'origine d'une tolérance élevée du biofilm à la fluoroquinolone ofloxacin (Bernier *et al.*, 2013). Les biofilms formés par des mutants de *P. aeruginosa* déficients dans la synthèse de divers polysaccharides extracellulaires sont souvent plus sensibles à l'action des antibiotiques (Colvin *et al.*, 2011; Goltermann and Tolker-Nielsen, 2017; Murakami *et al.*, 2017). Il également a été démontré que la réponse stringente, médiée par l'alarmone ppGpp, contribuait aux mécanismes de défense du biofilm chez *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *E. faecium* (Stewart *et al.*, 2015; Honsa *et al.*, 2017; Salzer *et al.*, 2020).

Dans une étude récente, Philip Stewart et son équipe ont cherché l'existence d'un gène, d'un ensemble de gènes ou d'une voie de tolérance exprimés spécifiquement dans les biofilms et partagés entre les trois espèces bactériennes étudiées, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *A. baumannii* (Stewart *et al.*, 2022). Ces trois espèces ont été cultivées en biofilm pendant 3 jours, puis chacune a été exposée à un antibiotique (ciprofloxacine, daptomycine et tigécycline respectivement) pendant 24 heures supplémentaires. Dans les trois cas, une sensibilité réduite aux antibiotiques a été observée dans les biofilms par rapport aux cultures planctoniques. Des études transcriptomiques ont ensuite permis de comparer le biofilm et la condition planctonique, ainsi que le biofilm traité aux antibiotiques et le biofilm non traité. Dans l'ensemble, les résultats ne soutiennent pas l'existence d'une base génétique ou biochimique commune à la tolérance des biofilms aux antibiotiques parmi les espèces bactériennes étudiées. Au contraire, chaque espèce semble présenter des *patterns* distincts d'expression génétique et de changements fonctionnels en réponse à l'exposition des biofilms à un antibiotique. Cette étude a permis aux auteurs d'avancer qu'il n'existe probablement pas de « talon d'Achille » moléculaire commun à tous les biofilms.

d) Bactéries persistantes

Alors que la limitation de la diffusion et la croissance lente sont responsables de la tolérance globale des bactéries du biofilm, la persistance bactérienne est un mécanisme qui ne concerne qu'une sous-population de cellules au sein biofilm. La persistance a été être considérée comme un état phénotypique extrême où les bactéries sont des cellules dormantes, sans croissance et métaboliquement inactives, ce qui les rend hautement tolérantes aux antibiotiques (Lewis, 2007). Les bactéries persistantes ont été découvertes dans les années 1940 dans des cultures planctoniques, lorsque Joseph Bigger ne parvenait pas à stériliser totalement un inoculum de *S. aureus* avec de la pénicilline (Bigger, 1944). De manière reproductible, quelques dizaines de bactéries survivaient, et ce, malgré l'augmentation de la concentration d'antibiotique ou de la durée de traitement. Il a ensuite démontré que ces bactéries, à

l'inverse de mutants résistants, ne pouvaient croître en présence d'un antibiotique. Au contact d'un milieu riche, elles reprenaient leur croissance tout en présentant une sensibilité normale aux antibiotiques.

Les bactéries persistantes sont observées dans les cultures planctoniques, mais le passage à un état de dormance se produit plus fréquemment en phase stationnaire et dans les biofilms. Bien que ces bactéries persistantes ne représentent qu'un faible pourcentage des cellules du biofilm, elles contribuent de manière significative à sa tolérance. Quand la plupart des cellules du biofilm sont tuées lors d'un traitement antibiotique, quelques bactéries persistantes peuvent constituer un réservoir d'agents pathogènes et pourront repeupler le biofilm une fois la pression antibiotique supprimée.

Comme les bactéries persistantes sont génétiquement identiques aux bactéries non persistantes, on considère actuellement que leur apparition est liée à une commutation phénotypique (ou switch) entre croissance et dormance. La question est donc de déterminer quels sont les mécanismes génétiques ou les facteurs environnementaux qui déclenchent ou augmentent la fréquence de cette commutation. On sait aujourd'hui que toutes les bactéries dormantes ne sont pas des persistantes et que toutes les bactéries persistantes ne sont pas dormantes. La dormance n'est donc ni nécessaire ni suffisante pour conduire à la commutation phénotypique et à l'apparition des bactéries persistantes (Shah *et al.*, 2006; Kint *et al.*, 2012; Orman and Brynildsen, 2013).

Les mécanismes qui sous-tendent l'entrée et la sortie de l'état persistant ne sont pas encore bien compris. Un des mécanismes étudiés porte sur l'implication des systèmes toxine-antitoxine (TA). Les systèmes TA sont généralement formés par une toxine relativement stable qui inhibe une fonction cellulaire majeure, comme la traduction ou la réplication, et par une antitoxine plus instable qui antagonise la toxine via la formation d'un complexe inactif. Lorsque les cellules subissent un stress, l'antitoxine est dégradée, libérant ainsi la toxine active qui peut alors cibler des processus cellulaires vitaux et entraîner une inhibition de la croissance bactérienne. Comme les toxines inhibent la croissance bactérienne, elles inhibent le fonctionnement de la cible des antibiotiques bactéricides (comme le ribosome par exemple), ce qui peut expliquer la survie des bactéries [pour une revue récente sur les systèmes TA, voir (Jurénas *et al.*, 2022)].

La première souche de *E. coli* hautement persistante à avoir été identifiée portait une mutation dans le locus *hipAB* (*hip* pour *high* persister) codant pour un module TA (Moyed and Bertrand, 1983). La toxine HipA est une sérine-protéine kinase qui phosphoryle GltX, une glutamyl-tRNA synthétase. HipA est inactivée par l'antitoxine HipB. Lorsque les niveaux de HipA dépassent un certain seuil, la synthèse des protéines est inhibée et la croissance cellulaire est arrêtée (Rotem *et al.*, 2010). Les cellules en arrêt de croissance peuvent devenir des persistantes tolérantes aux antibiotiques (Kaspy *et al.*, 2013; Schumacher *et al.*, 2015).

Bien que les systèmes TA ne semblent pas réguler à eux seuls la persistance, plusieurs études se sont penchées sur leur exploitation dans l'éradication de souches hautement persistantes. Une première

stratégie repose sur la conception de petits peptides capables de perturber les complexes TA (Sayed *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2017, 2020, 2021). Une autre stratégie explore l'utilisation de molécules antisens synthétiques stables qui empêchent l'expression de l'antitoxine mais pas celle de la toxine (Maleki *et al.*, 2018; Równicki *et al.*, 2018). Enfin, une stratégie a été élaborée en construisant des toxines séparées par des intéines. Les gènes codant pour ces fusions ont été délivrés par conjugaison dans une population mixte de bactéries et ne sont activées que chez des bactéries hébergeant des facteurs de transcription spécifiques. Ce système a permis l'élimination spécifique de *V. cholerae* résistant aux antimicrobiens dans des populations mixtes (López-Igual *et al.*, 2019).

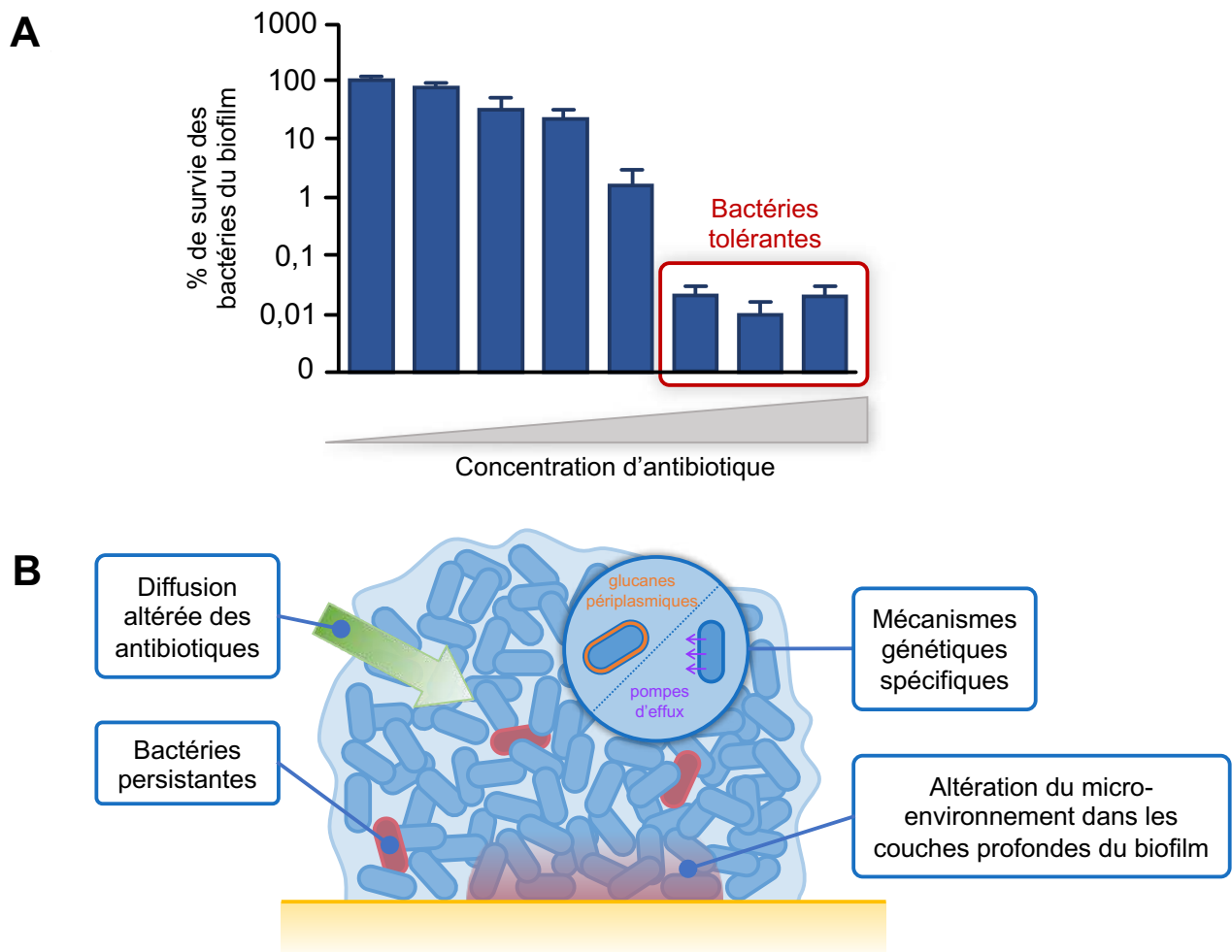


Figure 15. Tolérance des biofilms.

(A) Biofilm traité avec des concentrations croissantes d'antibiotiques pendant 24 heures. À partir d'une certaine concentration, le pourcentage de bactéries survivantes se stabilise, ce sont des bactéries tolérantes qui survivent mais ne se multiplient pas. (B) Hypothèses pouvant expliquer le phénomène de tolérance des biofilms vis-à-vis des biocides (antibiotiques et antiseptiques).

[Adaptée de (Lebeaux *et al.*, 2014)]

5. Stratégies d'éradication

a) Pipeline antimicrobien pré-clinique

Plusieurs nouveaux antibiotiques et potentialisateurs qui renforcent l'activité des antibiotiques font ou sont sur le point de faire l'objet d'essais cliniques. En 2020, une étude a recensé 407 nouveaux traitements antimicrobiens en cours de développement, dont 70 % visant de nouvelles cibles bactériennes (Figure 16) (Theuretzbacher *et al.*, 2020). Cette étude montre que le pipeline préclinique, contrairement à celui des projets cliniques, comprend plus de 70 % d'agents à action directe appartenant à de nouvelles classes, ayant de nouvelles cibles ou de nouveaux mécanismes d'action qui n'ont pas encore été utilisés chez les patients. Dans l'ensemble du pipeline établi par Theuretzbacher *et al.*, les approches antivirulence identifiées rassemblent un large éventail de stratégies pour empêcher la formation des biofilms, notamment par l'inhibition du *quorum-sensing*, de l'adhésion, de divers régulateurs et des bactéries persistantes. Une meilleure compréhension de ces mécanismes est indispensable pour développer de nouvelles molécules efficaces.

Une tendance notable vers le développement de médicaments à spectre étroit, voire spécifiques à un agent pathogène, rend nécessaire l'emploi d'outils de diagnostic capables de fournir des résultats précis et rapides ayant un impact sur la décision thérapeutique. Le développement d'antibiotiques à spectre étroit est essentiel pour limiter les effets indésirables de l'antibiothérapie sur la flore intestinale, notamment l'apparition de résistances, de dysbiose et d'inflammations médiées par des composants bactériens. Dans ce contexte, le laboratoire est un des acteurs du projet NASPEC récemment lancé (pour *Narrow spectrum antibiotics to fight the convergence of bacterial resistance*). Ce projet vise à concevoir des prodrogues sélectivement activées par les β -lactamases à large spectre produites par les pathogènes à Gram négatif, ce qui leur permet de cibler spécifiquement ces derniers tout en respectant la flore commensale.

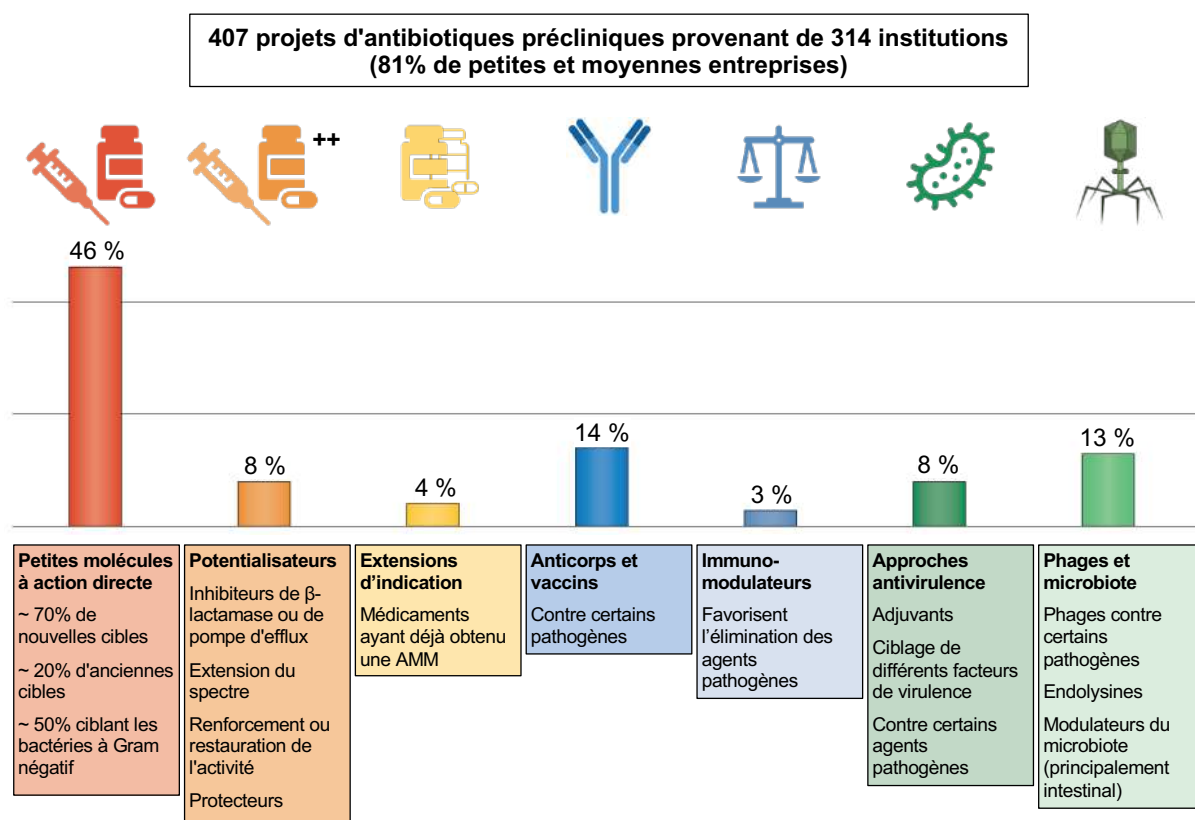


Figure 16. Vue d'ensemble du pipeline antibactérien préclinique au 1^{er} mai 2019.

Cette figure est extraite de l'étude de (Theuretzbacher *et al.*, 2020), qui recense 407 projets provenant de 314 entités de recherche et développement dans le monde. La grande majorité des institutions représentées sont des petites et moyennes entreprises (255 institutions sur 314 au total). Plus de la moitié d'entre elles sont situées en Amérique du Nord, suivie par l'Europe, deuxième continent le plus important. Les pays européens comptant cinq entreprises ou plus sont le Royaume-Uni, la France, la Suisse, le Danemark et les Pays-Bas. Les projets ont été classés dans sept grands groupes : agents à action directe, potentialisateurs de médicaments à action directe, extensions d'indication, anticorps et vaccins, immunomodulateurs, approches antivirulence, phages et produits liés aux phages.

b) Mesures préventives

Les mesures d'hygiène en contexte opératoire ne sont pas spécifiquement anti-biofilms, mais permettent cependant de limiter les risques d'adhérence bactérienne initiale. Il est connu depuis plusieurs années que l'application de mesures d'asepsie chirurgicale (*maximum sterile barrier precautions*) réduit le risque infectieux lors de la pose de cathéters centraux (O'Grady *et al.*, 2011).

L'utilisation de matériel imprégné d'antibactériens permet de libérer une concentration élevée d'agents antibactériens au niveau du site à risque de colonisation (Hetrick and Schoenfisch, 2006). Il est par exemple recommandé d'utiliser des cathéters centraux imprégnés avec une association

rifampicine/minocycline ou chlorhexidine/sulfadiazine argentique dans les cas où une infection persiste malgré la mise en place de mesures préventives strictes (Lebeaux and Ghigo, 2012). Divers revêtements antibactériens peuvent être utilisés, et sont constitués des billes de sulfate de calcium imprégnées d'antibiotiques dans les ciments osseux et recouverts d'alliage d'argent dans les cathéters urinaires (Meddings *et al.*, 2010; Dekker *et al.*, 2019). Les matériaux dentaires lavables à la chlorhexidine ou au glutaraldéhyde et les pansements en argent pour les plaies sont également couramment utilisés pour prévenir la formation de biofilms (Chen *et al.*, 2018; Khansa *et al.*, 2019). Ces mesures préventives présentent cependant des durées d'action limitées, ce qui restreint leur intérêt aux dispositifs de courte durée ou à la prévention des colonisations peropératoires ou postopératoires précoces.

La technique des verrous d'antibiotiques ou d'éthanol préventifs repose sur l'injection et le maintien d'un volume d'antibiotiques très concentrés dans la lumière du cathéter pendant 12 à 24h. Cette mesure est réservée aux patients porteurs d'un cathéter sur une longue durée, et ayant présenté de multiples complications infectieuses malgré la mise en place de mesures de prévention. Le recours à cette stratégie de manière plus large et durable risquerait de favoriser l'émergence de résistances bactériennes à l'antibiotique choisi (Landry *et al.*, 2010). Parallèlement, certaines équipes ont développé l'utilisation de verrous d'éthanol à 70 % à visée préventive avec des résultats prometteurs en nutrition parentérale pédiatrique ou en hémodialyse (Oliveira *et al.*, 2012). Les cations métalliques (magnésium, calcium, fer) étant essentiels à la croissance bactérienne, l'utilisation de verrous composés de chélateurs de ces métaux (EDTA, citrate) a également été proposée. Ces verrous permettraient d'inhiber la croissance bactérienne, de prévenir l'adhérence initiale, voire de favoriser la destruction des biofilms (Raad *et al.*, 2008).

c) Traitements curatifs

Le faible nombre de thérapies anti-biofilm ayant atteint la pratique clinique reflète la complexité de l'éradication des biofilms. Les antibiotiques restent un choix fréquent pour traiter ces infections, mais beaucoup agissent sur les bactéries métaboliquement actives. Une thérapie combinée ciblant à la fois les cellules métaboliquement actives et inactives au sein du biofilm serait donc optimale. Une combinaison de colistine et de ciprofloxacine est par exemple utilisée en clinique dans le traitement de la mucoviscidose. La colistine est plus efficace contre les bactéries à croissance anaérobie et cible les cellules persistantes à l'intérieur du biofilm, tandis que la ciprofloxacine cible les cellules plus superficielles (Chai *et al.*, 2019).

Compte tenu des difficultés que pose le traitement des biofilms par des antibiotiques, l'élimination physique du biofilm peut être la meilleure option, mécaniquement ou en retirant complètement le dispositif infecté dans le cas d'une infection liée à un matériel implanté (Sahni and Khashai, 2016;

Schiessler *et al.*, 2019). Cette décision peut être problématique pour certains dispositifs comme les stimulateurs cardiaques ou les prothèses orthopédiques, en raison des conséquences pour le patient et des coûts associés à l'immobilisation prolongée et à la pose d'un second matériel après antibiothérapie. Pour les dispositifs tels que les cathéters intraveineux, il est possible de recourir au verrou d'antibiotiques, d'agents chélateurs et d'éthanol, à visée curative cette fois (Raad *et al.*, 2016).

Les progrès dans l'ingénierie des peptides synthétiques et des protéines recombinantes, de la production d'anticorps et des études sur les phages ont ouvert des perspectives quant aux stratégies thérapeutiques pour le traitement des infections liées aux biofilms, présentées dans les sections qui suivent et schématisées dans la Figure 17 [pour une revue, voir (da Silva *et al.*, 2021)].

Augmentation de la dispersion

La dispersion fait partie du cycle du biofilm et peut être un événement actif régulé au cours duquel les bactéries s'échappent du biofilm et peuvent potentiellement coloniser de nouveaux sites, mais sont à nouveau sensibles au système immunitaire et aux antibiotiques. L'utilisation d'enzymes capables de dissocier les polymères composant la matrice ou l'utilisation de petites molécules comme le monoxyde d'azote (NO), l'acide cis-2-decenoid ou les acides aminés dextrogyres pourraient permettre de disperser les biofilms infectieux (Barraud *et al.*, 2014; Fleming and Rumbaugh, 2017). Cette approche est particulièrement adaptée aux biofilms développés en contexte industriel, mais elle entraîne la libération d'un grand nombre de bactéries à partir du site contaminé, induisant un risque de forte réponse inflammatoire et d'infection systémique aiguë (Wille and Coenye, 2020).

Recherche de nouvelles associations d'antimicrobiens

La combinaison de thérapies visant à la fois les cellules métaboliquement actives et inactives au sein des biofilms pourrait permettre d'améliorer les résultats d'un traitement. L'association d'antibiotiques avec des peptides antimicrobiens (PAM) ou des matériaux synthétiques comme le polymère peptidique cationique de chitosan et d'oligolysine est prometteuse (Chung and Khanum, 2017; Thappeta *et al.*, 2020). Les PAM et les polymères peptidiques cationiques peuvent agir de façon synergique avec les antibiotiques, permettant d'obtenir des CMI plus faibles et d'éliminer un taux plus élevé d'agents pathogènes. L'association de divers peptides avec des antibiotiques couramment utilisés a ainsi permis de prévenir la formation de biofilms et d'augmenter le taux d'élimination de *P. aeruginosa* (Eckert *et al.*, 2006). Dans une autre étude, le prétraitement de cathéters veineux centraux avec une association d'un peptide et de linézolide ou de vancomycine a réduit la formation de biofilms de *S. aureus* et le taux de bactériémie (Cirioni *et al.*, 2006). Dans modèle d'infection de plaie murine, un biofilm de *S. aureus*

résistant à la méticilline (SARM) a également été éliminé avec succès par de la vancomycine conjuguée à la D-octaarginine (Antonoplis et al., 2018).

Utilisation de phages

Les phages sont des virus qui ciblent les espèces bactériennes dont ils sont isolés, avec un effet minimal sur la flore commensale [pour une revue sur le potentiel des thérapies phagiques, voir (Brives and Pourraz, 2020)]. Les phages peuvent pénétrer dans les biofilms par des canaux aqueux ou dégrader la matrice grâce à des dépolymérase (Pires *et al.*, 2016). Des cocktails de phages ont permis d'éradiquer des biofilms de *P. aeruginosa* dans des poumons de souris (Forti et al., 2018), de réduire et de prévenir la formation de biofilms de *Proteus mirabilis* sur des cathéters (Maszewska *et al.*, 2018), d'éliminer les biofilms de *S. aureus* dans des plaies (Seth *et al.*, 2013) et de traiter un modèle de biofilm oral formé *in vitro* par *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *E. faecalis* et *Streptococcus mutans* (Szafranski *et al.*, 2017). Cependant, une résistance aux phages peut se développer et la structure du biofilm en communautés structurées favorise la coexistence de bactéries résistantes et sensibles aux phages (Simmons *et al.*, 2020). De plus, les phages sont rapidement éliminés par le système immunitaire de l'hôte.

Les lysines, enzymes dérivées des phages, sont efficaces pour perturber les biofilms en dégradant la paroi cellulaire bactérienne et peuvent agir sur des cellules métaboliquement inactives. Ces lysines protéolytiques de phages peuvent être modifiées pour leur conférer une plus grande stabilité et une meilleure activité antibactérienne. Des lysines chimériques dans lesquelles le domaine de liaison à la paroi cellulaire a été échangé ont montré une spécificité d'espèce, ne lysant pas *E. faecium* tout en ciblant *E. faecalis* et des staphylocoques (Binte Muhammad Jai et al., 2020). La lysine recombinante CF-301, associée à des antibiotiques, fait l'objet d'essais cliniques pour traiter l'endocardite et la bactériémie à SARM (Indiani *et al.*, 2019).

Utilisation d'anticorps

Les anticorps monoclonaux humanisés recombinants présentent une immunogénicité réduite pour l'hôte par rapport aux anticorps produits par d'autres espèces. *In vivo*, un traitement prophylactique avec des anticorps dirigés contre les adhésines bactériennes permet de prévenir la formation de biofilms (Domanski *et al.*, 2005). Les anticorps dirigés vers les composants de la matrice, comme les protéines de liaison à l'ADN, peuvent déstabiliser la structure du biofilm, perturber sa maturation ou déclencher sa dispersion en interférant avec les mécanismes de *quorum-sensing* (Mokrzan *et al.*, 2020). Des anticorps ciblant la famille DNABII des protéines bactériennes de liaison à l'ADN, qui servent de composants structurels critiques dans l'échafaudage de l'ADN extracellulaire des biofilms, ont

récemment montré de bons résultats dans une étude préclinique menée sur deux modèles d'infections médiées par les biofilms, l'otite et la rhinosinusite (Martyn *et al.*, 2020; Novotny *et al.*, 2020). Les anticorps sont de grosses molécules avec une demi-vie de plusieurs jours et peuvent provoquer des réponses immunitaires. Les « nanocorps », possédant des domaines variables de liaison à l'antigène plus petits et une demi-vie plus longue, sont testés comme substituts d'anticorps dans le traitement des infections associées aux biofilms (Menzel *et al.*, 2018).

Autres immunothérapies

Bien qu'ils ne soient pas nouveaux, les vaccins pourraient potentiellement prévenir l'établissement de biofilms (Micoli *et al.*, 2021). Le DNABII est étudié comme « antigène du biofilm » et de futurs vaccins pourraient l'utiliser dans leurs formulations (Novotny *et al.*, 2019).

Les macrophages sont des acteurs importants de la réponse aux infections microbiennes. Les biofilms ont cependant développé des mécanismes leur permettant d'échapper à la capture et à la destruction par les macrophages. Ces mécanismes empêchent la phagocytose des biofilms de *S. aureus* par les macrophages et atténuent l'inflammation dans un modèle murin d'infection de cathéter par un biofilm de *S. aureus* (Thurlow *et al.*, 2011). Récemment, il a été démontré que des « *macrophage backpacks* » constitués de polymères pouvaient se fixer à la surface des macrophages et délivrer de façon régulière de l'IFN- γ pour prolonger l'état inflammatoire des macrophages et favoriser la clairance bactérienne (Shields *et al.*, 2020). L'ajout d'autres agents immunomodulateurs dans ces « *backpacks* » ou leur utilisation en combinaison avec des agents de dispersion du biofilm pourrait augmenter la capacité des macrophages à attaquer les cellules bactériennes ainsi dispersées.

Utilisation de nanoparticules

De nombreuses études se concentrent sur le développement de stratégies basées sur une libération lente et continue de médicaments au niveau du biofilm. Les nanoparticules sont de plus en plus utilisées pour libérer des substances antimicrobiennes, et certaines ont montré leur efficacité à encapsuler et à libérer de façon régulière une série d'antimicrobiens, y compris des antibiotiques conventionnels ou des métaux comme l'argent et le cuivre (Gupta *et al.*, 2019). Parmi les exemples les plus probants, citons les nanoparticules conçues pour délivrer du NO dans les infections sinusales chroniques à *S. aureus* (Jardeleza *et al.*, 2015) et les nanoparticules encapsulant des PAM et des aptamères, qui sont des molécules peptidiques ou nucléotidiques pouvant se lier à différentes cibles bactériennes et contribuer à leur destruction (Jo and Ban, 2016; Pletzer *et al.*, 2016). Des nanoparticules pouvant libérer différentes doses de H₂O₂ dans le temps ou lorsqu'elles sont confrontées à un pH spécifique ont été utilisées pour traiter les caries dentaires *in vivo* (Gao *et al.*, 2016).

Les liposomes, nanoparticules composées d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides, peuvent pénétrer les biofilms et délivrer des antibiotiques avec une cytotoxicité mineure pour l'hôte. Différentes préparations à base de liposomes couplés à de la ciprofloxacine et de l'amikacine sont testées chez des patients atteints de mucoviscidose, dans le traitement des infections pulmonaires à *P. aeruginosa* (Clancy *et al.*, 2013; Cipolla *et al.*, 2016).

Modification des surfaces

Une autre stratégie pour prévenir l'adhésion bactérienne consiste à modifier la surface des matériaux avec des agents biocides. Les approches les plus récentes visent non seulement à imprégner les surfaces des dispositifs médicaux d'agents antimicrobiens, mais aussi à en modifier certains aspects, comme la texture et l'hydrophilie (P. and P., 2020). Une hydrophobie améliorée pourrait rendre les surfaces « autonettoyantes », empêchant l'accumulation de protéines et l'adhérence bactérienne (Khanmohammadi Chenab *et al.*, 2019).

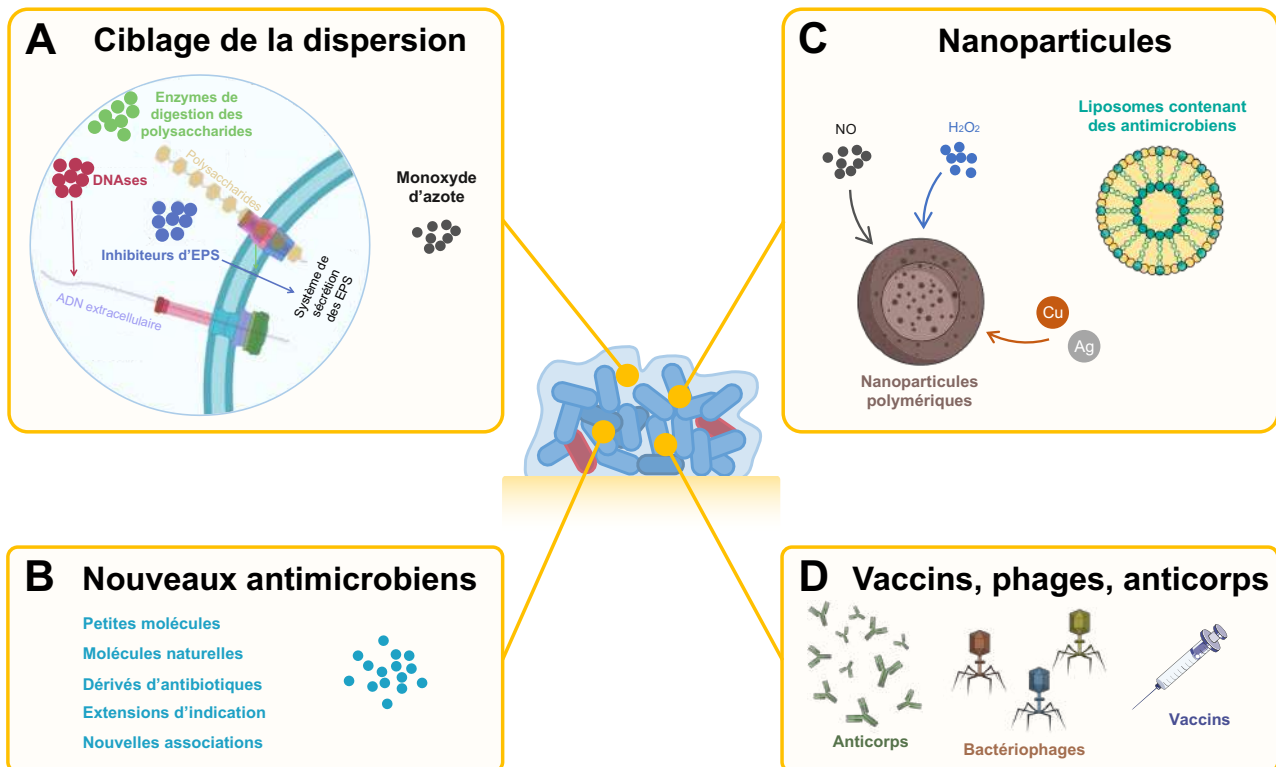


Figure 17. Stratégies thérapeutiques prometteuses pour l'éradication des biofilms.

(A) Les nucléases, les enzymes digérant les polysaccharides et les inhibiteurs d'EPS sont en cours d'étude pour empêcher l'établissement des biofilms ou pour disperser les biofilms matures. Bien que ces composés aient un fort potentiel pour des thérapies combinatoires, la dispersion des cellules du biofilm peut entraîner une réinfection et conduire à une septicémie. (B) Des petites molécules, des molécules naturelles, des dérivées d'antibiotiques, des extensions d'indication et de nouvelles associations susceptibles de cibler les biofilms sont également à l'étude.

Ces composés possèdent des modes d'action multiples et peuvent fonctionner en combinaison pour mieux cibler l'hétérogénéité du biofilm. L'utilisation d'antibiotiques peut cependant mener à l'apparition de résistances, ils ne ciblent pas spécifiquement les bactéries pathogènes et peuvent affecter le microbiome, et leur pénétration dans le biofilm est limitée. **(C)** Les nanoparticules fabriquées à partir de polymères peuvent encapsuler et délivrer une large gamme d'agents biocides tels que l'argent, le cuivre, le monoxyde d'azote (NO) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les liposomes sont des nanoparticules particulièrement intéressantes en raison de leur faible toxicité pour l'hôte lors de la libération continue d'antimicrobiens. **(D)** Les vaccins, les phages et les anticorps sont particulièrement intéressants en raison de leur spécificité et de leur spectre étroit. Ils ont de bonnes capacités de pénétration et sont permettent de déclencher une réponse immunitaire bénéfique de l'hôte. Leur action pourrait cependant entraîner un remplacement de l'agent pathogène par un autre agent pathogène opportuniste, et leur pharmacocinétique et pharmacodynamie reste un sujet d'étude.

[Adaptée de (da Silva *et al.*, 2021)]

OBJECTIFS

Le peptidoglycane est une macromolécule essentielle et spécifique de la paroi bactérienne, qui maintient la forme des cellules, assure une protection mécanique contre la pression osmotique exercée par le cytoplasme et sert à l'ancrage de polymères de l'enveloppe. Il est réticulé par deux familles d'enzymes : les PLP qui catalysent la formation de ponts de type 4→3, et les LDT qui forment les ponts de type 3→3. Alors que les PLP sont potentiellement inhibées par tous les antibiotiques de la famille des β-lactamines, les LDT sont efficacement inhibées par une seule classe de β-lactamines, les carbapénèmes. La contribution relative des PLP et des LDT à la réticulation du peptidoglycane est très variable entre les espèces bactériennes. Chez *E. coli*, comme dans la plupart des bactéries, le peptidoglycane est principalement réticulé par les PLP, et les LDT n'ont qu'une contribution mineure et non essentielle à sa synthèse. Dans les années 80, une étude avait révélé une augmentation de la contribution des LDT en phase stationnaire de croissance, mais leur rôle dans l'adaptation du métabolisme du peptidoglycane aux conditions environnementales n'avait pas été évalué. De plus, ces observations ont porté sur des cultures liquides, composées de cellules planctoniques en suspension dans le milieu de culture. Or, l'essentiel de la biomasse microbienne se développe sous la forme de communautés de bactéries attachées à une surface. Les bactéries au sein de ces biofilms présentent une remarquable tolérance aux défenses de l'hôte et aux antibiotiques, constituant un enjeu médical majeur.

Dans ce contexte, l'objectif général du projet a été d'étudier le rôle des LDT dans l'adaptation de la voie d'assemblage du peptidoglycane et de sa liaison à la membrane externe à la croissance en biofilm et de déterminer le rôle de cette adaptation dans la tolérance des bactéries aux antibiotiques. Pour cela, deux espèces bactériennes ont été choisies :

(i) *Escherichia coli*, qui possède 6 paralogues de la famille des LDT aux fonctions partiellement redondantes. Le but a été d'identifier les changements dans la structure du peptidoglycane associés à la croissance en biofilm et d'évaluer le rôle des LDT dans l'adaptation à diverses conditions environnementales. Nous avons également voulu savoir si la perte de LDT spécifiques modifiait la libération de molécules pro-inflammatoires par *E. coli*.

(ii) *Pseudomonas aeruginosa*, chez qui aucune LDT n'avait été caractérisée. Le but a été d'identifier ces enzymes, de caractériser leurs fonctions, ainsi que les conséquences de leur délétion sur la sensibilité de la souche aux antibiotiques, la stabilité de l'enveloppe et la formation de biofilms *in vitro*.

RÉSULTATS

Introduction aux articles

Escherichia coli et *Pseudomonas aeruginosa* font partie des bactéries modèles les plus étudiées dans la formation de biofilm en laboratoire. Facilement manipulables, ces deux bactéries à Gram négatifs sont en outre responsables d'un grand nombre d'infections liées à la formation de biofilms particulièrement difficiles à éradiquer. Selon le NIH (*National Institutes of Health*) et le CDC (*Center for Disease Control and Prevention*), jusqu'à 80 % du nombre total d'infections microbiennes et plus de 60 % des infections nosocomiales sont dues à la formation de biofilms. En 2011, un rapport de l'OMS estimait à plus de 4 millions le nombre de patients touchés chaque année par une infection nosocomiale en Europe (World Health Organization, 2011). 37 000 décès par an seraient directement imputables à ces infections nosocomiales, qui contribueraient à 110 000 décès supplémentaires chaque année en Europe. Selon ce même rapport, les infections les plus fréquemment transmises dans les hôpitaux européens sont des infections urinaires, des voies respiratoires inférieures, du site opératoire, ainsi que des bactériémies.

E. coli est impliquée dans 50 % des infections liées à la formation de biofilms sur des cathéters urinaires (Jacobsen *et al.*, 2008). *P. aeruginosa* est quant à elle responsable de 10 à 20 % de la totalité des infections nosocomiales à elle seule selon une étude menée au Brésil sur cinq ans (Ramos *et al.*, 2013). *P. aeruginosa* est également un pathogène opportuniste qui colonise les poumons des patients atteints de mucoviscidose en formant d'épais biofilms résistants aux antibiotiques et aux défenses immunitaires de l'hôte, péjorant ainsi le pronostic à long terme du patient infecté (Høiby *et al.*, 2010).

En 2017, l'OMS a publié une liste de pathogènes « prioritaires » qui répertorie les douze familles de bactéries représentant les plus grandes menaces pour la santé humaine ([accessible en ligne](#)) (Tacconelli *et al.*, 2018). Cette liste est divisée en trois catégories selon l'urgence du besoin en nouveaux antibiotiques. Le groupe le plus critique comprend notamment *Pseudomonas* et diverses *Enterobacteriaceae* dont *E. coli*. Ces bactéries sont devenues résistantes à un grand nombre d'antibiotiques, dont les carbapénèmes et les céphalosporines de troisième génération qui sont les meilleurs antibiotiques disponibles actuellement pour traiter les bactéries multirésistantes. Ce rapport souligne l'importance des efforts de recherche pour le développement de nouveaux antibiotiques et leur utilisation rationnelle, basés sur une meilleure compréhension de la mécanique bactérienne.

Les travaux présentés dans la suite de ce manuscrit se focalisent sur l'étude du peptidoglycane de *E. coli* et *P. aeruginosa*. Essentiel à la survie des bactéries, sa réticulation est assurée par deux catégories d'enzymes, les PLP et les LDT dont la contribution relative est variable. Ces enzymes sont les cibles des antibiotiques de la famille des β -lactamines, mais tandis que les PLP sont potentiellement inhibées par toutes les classes de β -lactamines, les LDT sont efficacement inhibées par les carbapénèmes seulement. L'activité des PLP peut être entièrement contournée par les LDT, comme cela a été observé dans des mutants de *E. coli* et *E. faecium* sélectionnés *in vitro*, ce qui entraîne un haut niveau de

résistance à toutes les classes de β -lactamines à l'exception des carbapénèmes (Hugonnet *et al.*, 2016; Mainardi *et al.*, 2000). Ces dernières années, les fonctions associées aux LDT se sont diversifiées au fur et à mesure de leur caractérisation chez différentes espèces bactériennes. Les deux articles qui suivent portent sur l'étude des LDT des deux bactéries à Gram négatif étudiées, *P. aeruginosa* et *E. coli*, et sur le rôle de ces enzymes dans l'adaptation du peptidoglycane à différentes conditions de croissance.

Le premier article se concentre sur les LDT de *P. aeruginosa*, dont les identités demeuraient jusqu'alors inconnues. Des analyses *in silico* ont permis d'identifier trois paralogues des LDT, que nous avons appelés Ldt_{Pae1}, Ldt_{Pae2} et Ldt_{Pae3}. L'utilisation d'approches complémentaires *in vitro*, comprenant l'expression hétérospécifique des gènes codant pour les *ldt* de *P. aeruginosa* ainsi que leur inactivation, seuls ou en combinaison, a par la suite permis de leur attribuer des fonctions. L'activité de Ldt_{Pae1} a pu être observée lors d'essais enzymatiques *in vitro*. Nous avons également évalué l'impact de la délétion des gènes codant pour les *ldt* sur l'activité des β -lactamines, la motilité de la souche, la stabilité de l'enveloppe, et la capacité des mutants à former des biofilms. L'ensemble de ces résultats indique que les LDT contribuent à la stabilisation de l'enveloppe cellulaire bactérienne et à l'adaptation du métabolisme du peptidoglycane à la croissance en biofilm.

Le second article présente une étude approfondie des LDT de *E. coli*, dont les identités et les fonctions sont connues. YcbB et YnhG sont responsables de la formation des ponts de type 3→3 pour la réticulation du peptidoglycane (Magnet *et al.*, 2008) ; YbiS, ErfK et YcfS ancrent la lipoprotéine de Braun au peptidoglycane, assurant le seul lien covalent entre le peptidoglycane et la membrane externe (Magnet *et al.*, 2007) ; YafK peut hydrolyser cette liaison (Bahadur *et al.*, 2021; Winkle *et al.*, 2021). Avant le début de ma thèse, les résultats préliminaires du laboratoire d'accueil avaient révélé une proportion importante de ponts de type 3→3 lors de la croissance de *E. coli* en biofilm et en milieu minimum, posant la question du rôle des LDT dans l'adaptation du métabolisme du peptidoglycane aux conditions environnementales. Nous avons développé une analyse structurale détaillée du peptidoglycane extrait de bactéries cultivées en milieu minimum et en milieu riche, en conditions planctoniques de croissance et en biofilm. L'inactivation des gènes codant pour les *ldt* a permis d'évaluer leur rôle dans la formation de ces biofilms et l'impact des délétions sur la stabilité de l'enveloppe et l'activité d'un large panel d'antibiotique. Une dernière partie évalue l'impact de la perte des LDT sur la libération de molécules pro-inflammatoires par *E. coli*. Ces multiples approches nous ont permis d'explorer le rôle des LDT dans la stabilité de l'enveloppe et la stimulation du système immunitaire.

Article 1

Soumis dans *Microbiology Spectrum*

Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* L,D-transpeptidases and evaluation of their role in peptidoglycan adaptation to biofilm growth

Inès Hugonneau-Beaufet^a, Jean-Philippe Barnier^{a,b,c}, Stanislas Thiriet-Rupert^d, Sylvie Létoffé^d, Jean-Luc Mainardi^{a,b,c}, Jean-Marc Ghigo^d, Christophe Beloin^{*d}, Michel Arthur^{*a}

^a Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, INSERM, Université Paris Cité, F-75006 Paris France

^b Service de Microbiologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, F-75015 Paris France

^c Université Paris Cité, Faculté de Santé, UFR de Médecine, F-75015 Paris France

^d Institut Pasteur, Université Paris Cité, UMR CNRS 6047, Genetic of Biofilms laboratory, F-75015 Paris France

*Corresponding authors

Running title: *Pseudomonas aeruginosa* L,D-transpeptidases

ABSTRACT

Peptidoglycan is an essential component of the bacterial cell envelope that sustains the turgor pressure of the cytoplasm, determines cell shape, and acts as a scaffold for the anchoring of envelope polymers such as lipoproteins. The final cross-linking step of peptidoglycan polymerization is performed by classical D,D-transpeptidases belonging to the penicillin-binding protein (PBP) family and by L,D-transpeptidases (LDTs), which are dispensable for growth in most bacterial species and whose physiological functions remain elusive. In this study, we investigated the contribution of LDTs to cell envelope synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* grown in planktonic and biofilm conditions. We first assigned a function to each of the three *P. aeruginosa* LDTs by gene inactivation in *P. aeruginosa*, heterospecific gene expression in *Escherichia coli*, and, for one of them, direct determination of its enzymatic activity. We found that the three *P. aeruginosa* LDTs catalyze peptidoglycan cross-linking (Ldt_{Pae1}), the anchoring of lipoprotein OprI to the peptidoglycan (Ldt_{Pae2}), and the hydrolysis of the resulting peptidoglycan-OprI amide bond. Construction of a phylogram revealed that LDTs performing each of these three functions in various species cannot be assigned to evolutionary distinct lineages, in contrast to what has been observed with PBPs. We showed that biofilm, but not planktonic, bacteria displayed an increase proportion of peptidoglycan cross-links formed by Ldt_{Pae1} and a higher extent of OprI anchoring to peptidoglycan, which is controlled by Ldt_{Pae2} and Ldt_{Pae3}. Consistently, deletion of each of the *ldt* gene impaired biofilm formation and potentiated the bactericidal activity of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). These results indicate that LDTs contribute to the stabilization of the bacterial cell envelope and to the adaptation of peptidoglycan metabolism to growth in biofilm.

Importance. Active-site cysteine LDTs form a functionally heterologous family of enzymes that contribute to the biogenesis of the bacterial cell envelope through formation of peptidoglycan cross-links and through the dynamic anchoring of lipoproteins to peptidoglycan. Here, we report the role of three *P. aeruginosa* LDTs that had not been previously characterized. We show that these enzymes contribute to resistance to the bactericidal activity of EDTA and to the adaptation of cell envelope polymers to conditions that prevail in biofilms. These results indicate that LDTs should be considered as putative targets in the development of drug-EDTA associations for the control of biofilm-related infections.

INTRODUCTION

Peptidoglycan (PG) is a major component of the cell envelope present in almost all bacterial species. This complex heteropolymer is composed of linear glycan chains cross-linked by short stem peptides to form a three-dimensional network that surrounds the cytoplasmic membrane and provides resistance to the turgor pressure of the cytoplasm (1). The glycan chains are formed by alternating *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) residues linked together by β -1,4 glycosidic bonds. In Gram-negative bacteria, the D-lactoyl group of MurNAc residues are linked to a conserved peptide stem containing an L-alanine at the first position (L-Ala¹), a D-glutamic acid at the second position (D-Glu²), a diaminopimelic acid at the third position (DAP³), and two D-alanine at the fourth and fifth positions (D-Ala⁴ and D-Ala⁵). In Gram-positive bacteria, DAP³ is often amidated or replaced by an L-Lysine (L-Lys³), which can be substituted by a short side chain (*e.g.* a pentaglycine in *Staphylococcus aureus*).

The peptide stems of two adjacent subunits are linked together by peptide cross-links formed by transpeptidases. Most cross-links connect D-Ala⁴ in an acyl donor stem peptide to DAP³ in an acyl acceptor stem peptide. Synthesis of these so-called 4 \rightarrow 3 cross-links is catalyzed by the D,D-transpeptidase activity of Penicillin-Binding Proteins (PBPs) in two steps (2). First, the catalytic serine of PBPs attacks the carbonyl of D-Ala⁴ in a donor stem pentapeptide resulting in the formation of an acyl-enzyme and release of D-Ala⁵. Second, the ester bond of the acyl-enzyme is attacked by the side-chain amine of the residue at the 3rd position of an acceptor stem peptide, resulting in the formation of a 4 \rightarrow 3 cross-linked peptidoglycan dimer and the release of the PBP (2).

In certain bacteria, peptidoglycan cross-linking is additionally performed by a second family of enzymes, the L,D-transpeptidases (LDTs), which connect residues at the 3rd position

of the donor and acceptor stems (3→3 cross-links) (Reaction A in Fig. 1) (3, 4). Similar to PBPs, LDTs catalyze peptidoglycan cross-linking by a two-step mechanism involving formation of an acyl-enzyme. However, the acyl donor used by LDTs harbors a tetrapeptide stem instead of a pentapeptide stem. The tetrapeptide-containing substrate of LDTs is formed by hydrolysis of the D-Ala⁴-D-Ala⁵ amide bond of pentapeptide stems by D,D-carboxypeptidases (5–7). LDTs and PBPs also differ by the catalytic nucleophile, Cys *versus* Ser, and the two enzyme families are structurally unrelated (8). PBPs and LDTs are inactivated through acylation of their nucleophiles. PBPs are potentially inactivated by all classes of β-lactams. In contrast, LDTs are effectively inactivated only by β-lactams belonging to the carbapenem class (9–13).

Since the first characterization of an LDT in a highly ampicillin-resistant mutant of *Enterococcus faecium* selected *in vitro* (4), numerous members of the LDT family have been identified in Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as in mycobacteria (14–17). The number of LDTs varies between bacterial species, ranging from one in *Neisseria meningitidis* and *Helicobacter pylori* to 21 in *Bradyrhizobium japonicum* (18). A wide variety of functions has been associated with these enzymes that can be classified in three groups as follows.

A first group of LDTs forms 3→3 peptidoglycan cross-links and comprises enzymes with various physiological functions (Reaction A in Fig. 1). Certain LDTs participate in the maturation of peptidoglycan in *Mycobacterium smegmatis* (19, 20) and in β-lactam resistance in mutants of *Escherichia coli* and *E. faecium* selected *in vitro* (4, 7). In the latter mutants, the LDTs can fully replace the PBPs resulting in a peptidoglycan exclusively containing 3→3 cross-links. The proportion of 3→3 cross-links formed by LDTs is highly variable in wild-type bacteria, ranging from 70-80% in *Clostridioides difficile* (14) and in mycobacteria (21, 22), to <10 % in most species, including in *E. coli* (23). LDTs are essential for virulence in *Mycobacterium*

tuberculosis (24) but fully dispensable in *E. coli*, at least for growth in laboratory conditions. In the latter bacterium, the proportion of 3→3 cross-links increases in the stationary phase of growth but this observation has not been associated with any phenotypic property (25). In *E. coli*, 3→3 cross-link formation was reported to participate in peptidoglycan remodeling, thereby increasing the overall robustness of the bacterial cell envelope in response to defects in the outer membrane (26). In *Salmonella enterica* serovar Typhi, an L,D-transpeptidase plays an essential role in typhoid toxin secretion (27). The enzyme edits the peptidoglycan, *i.e.* enriches peptidoglycan at the cell poles in 3→3 cross-links, thereby enabling specific cleavage of these cross-links by a specialized muramidase for translocation of the toxin through the peptidoglycan layer. This subsequently enables the release of the toxin through the outer membrane.

A second group of LDTs is specialized in the covalent anchoring of proteins to peptidoglycan (Reaction B in Fig. 1). In *E. coli*, three LDTs anchor the Braun lipoprotein (Lpp) providing a link between the peptidoglycan and the outer membrane that is thought to contribute to the stability of the envelope (28–30). In *Coxiella burnetii*, the cell envelope was proposed to be similarly stabilized by the anchoring of an outer membrane barrel protein to peptidoglycan by an LDT during the stationary phase of growth (31).

A third group of LDTs comprises enzymes acting as hydrolases (Reaction C in Fig. 1). In *E. coli*, a member of the LDT family, YafK also known as DpaA, was found to exclusively display hydrolytic activity for cleavage of the amide bond connecting Lpp to tripeptide stems (32, 33). In combination with LDTs that anchor Lpp, this enzyme may dynamically control the equilibrium between the free and peptidoglycan-linked forms of Lpp.

In addition to the three types of amide-bond forming and hydrolyzing activities depicted as reactions A, B, and C in Fig. 1, LDTs catalyze the exchange of the terminal D-Ala⁴

of tetrapeptide stems by glycine and various D-amino (*e.g.* D-Met) and D-2-hydroxy (*e.g.* D-lactate) acids (3). For the latter reactions, the acyl-enzyme is attacked by the amine or hydroxyl group of free amino or 2-hydroxy acids. This exchange reaction results in the incorporation of D-amino acids in the peptidoglycan leading to toxic effects. In *Vibrio cholerae*, non-canonical D-amino acids promote remodeling of peptidoglycan in stationary phase and participate in the control of PG abundance and strength (34).

Attack of the acyl-enzyme by a water molecule results in the hydrolysis of the DAP³-D-Ala⁴ amide bond. In *Acinetobacter baumannii*, a hydrolytic member of the LDT family acts as an L,D-carboxypeptidase trimming off D-Ala⁴ of tetrapeptide stems thereby contributing to peptidoglycan recycling (35).

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic Gram-negative pathogen, responsible for both acute respiratory infections, in particular ventilator acquired pneumonia, and chronic lung infections in patients with cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. The ability of *P. aeruginosa* to form biofilms is critical in the pathophysiology of these infections (36–38).

In this study, we show that the chromosome of *P. aeruginosa* harbors three genes encoding members of the LDT family. We report a functional characterization of each of these three enzymes and the consequences of *ldt* gene deletions on antibiotic susceptibility, envelope stability, and *in vitro* formation of biofilms by *P. aeruginosa*.

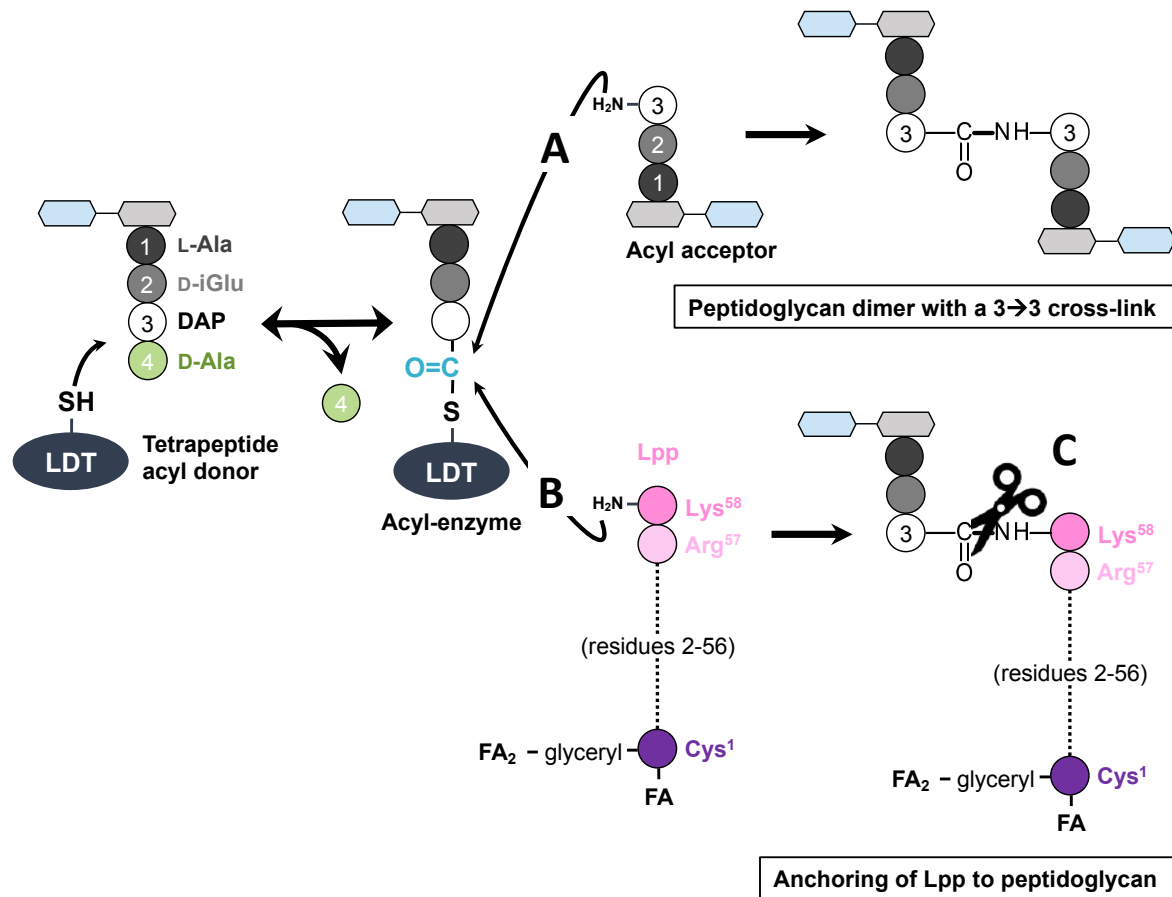


Figure 1. Two-step reactions catalyzed by LDTs. In the first step, the catalytic cysteine attacks the carbonyl of D-Ala⁴ at the extremity of an acyl donor tetrapeptide stem. This results in the formation of an acyl-enzyme and the release of D-Ala⁴. In the second step, the carbonyl of the thioester bond in the acyl-enzyme is attacked by a side-chain amine harbored either by DAP³ in an acceptor stem peptide (reaction A, formation of 3→3 cross-links) or by the C-terminal L-Lys of Lpp (reaction B, Lpp anchoring). Other members of the LDT family hydrolyze the tripeptide→Lpp amide bond (reaction C, release of Lpp). Abbreviations: DAP, diaminopimelic acid; D-iGlu, D-isoglutamic acid; Lpp, major outer membrane Braun lipoprotein; FA, fatty acid.

RESULTS

***P. aeruginosa* and *E. coli* share a common peptidoglycan structure.** Our first objective was to determine the structure of peptidoglycan isolated from a stationary phase culture of *P. aeruginosa* strain PA14. Peptidoglycan was extracted, digested with muramidases, and the resulting muropeptides were separated by *rp*HPLC (Fig. 2A). Mass spectrometry analysis (Fig. 2B and Supplementary Table S1) revealed that the most abundant stem peptide was a tetrapeptide (L-Ala-D-iGlu-DAP-D-Ala), both in monomers and in the acceptor stem of dimers. The pentapeptide stem (L-Ala-D-iGlu-DAP-D-Ala-D-Ala) was not detected, indicating that the terminal D-Ala of stem pentapeptides that did not participate in peptidoglycan cross-linking were effectively trimmed off by D,D-carboxypeptidases. Cleavage of DAP-D-Ala amide bonds by L,D-carboxypeptidases or by endopeptidases generated the tripeptide stem L-Ala-D-iGlu-DAP. Most of the dimers (87%) contained 4→3 cross-links made by the D,D-transpeptidase activity of PBPs. The remaining dimers (13%) contained 3→3 cross-links formed by L,D-transpeptidases. Detection of the tripeptide L-Ala-D-iGlu-DAP linked to a Lys-Arg dipeptide (Tri→KR) revealed the anchoring of the OprI lipoprotein to the peptidoglycan (Reaction B in Fig. 1). OprI is a homolog (24.8 % identity) of the Lpp Braun lipoprotein of *E. coli* (Supplementary Fig. S1). The disaccharide moiety was composed exclusively of GlcNAc and reduced MurNAc. De-acylated sugars, as previously reported (39, 40), were not detected, indicating that the corresponding muropeptides were present in insufficient amounts to be identified in our study design. Together, these results showed that all muropeptides detected in *E. coli* (23) are present in *P. aeruginosa* PA14. Conversely, no additional structure was detected in *P. aeruginosa*. Quantitatively, the muropeptide compositions were also very similar indicating that the peptidoglycan structure is conserved in *P. aeruginosa* and *E. coli*.

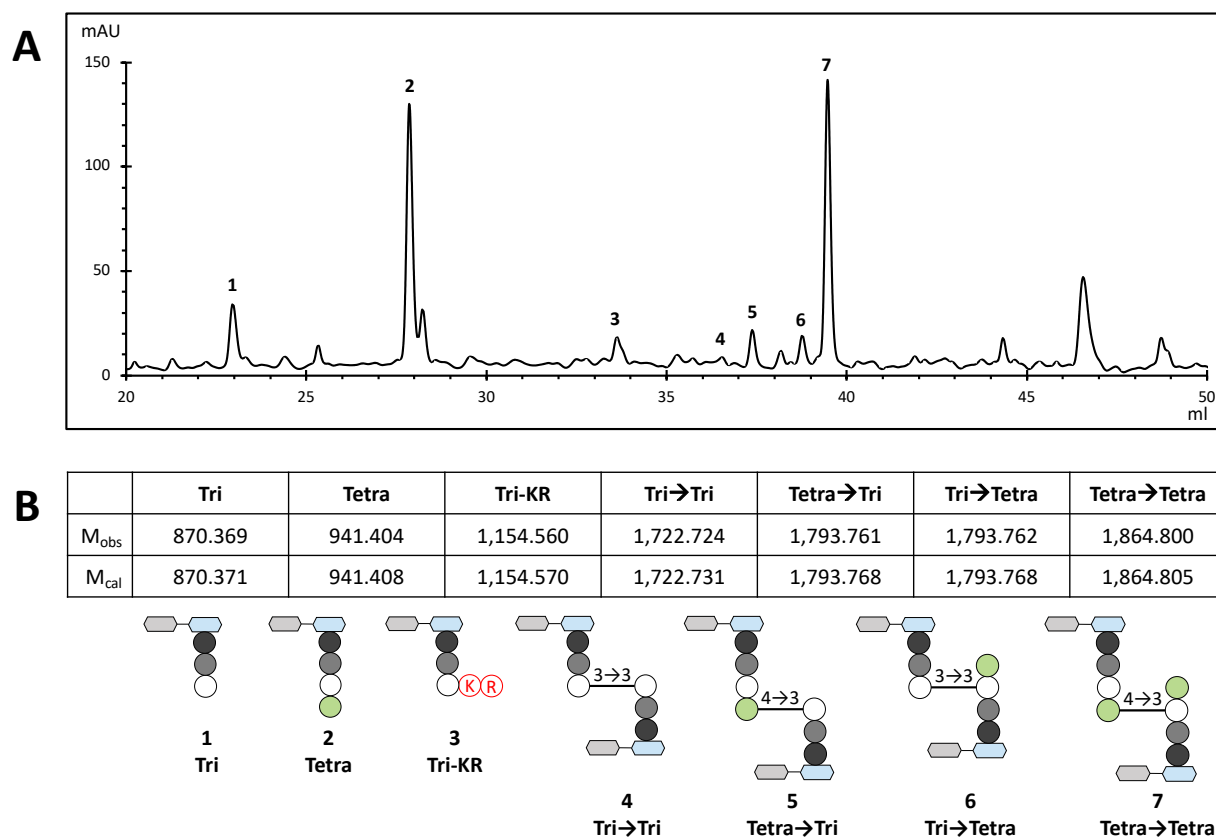


Figure 2. Muropeptide composition of the peptidoglycan of *P. aeruginosa* strain PA14. (A) *rpHPLC* profile of muropeptides. **(B)** Structure of muropeptides. M_{obs} , observed monoisotopic mass; M_{cal} , calculated monoisotopic mass; grey hexagon, GlcNAc; blue hexagon, MurNAc; black disk, L-Ala; grey disk, D-iGlu; white disk, DAP; green disk, D-Ala; K and R circled in red, amino acid residues corresponding to the Arg-Lys C-terminal extremity of OprI.

Heterospecific expression of *P. aeruginosa* *ldt* genes in *E. coli* reveals the function of the corresponding LDTs. Our next objective was to identify the LDTs catalyzing the formation of 3→3 cross-linked muropeptides 4 and 6 and the anchoring of OprI to the peptidoglycan (Reactions A and B in Fig. 1, respectively). Sequence comparisons identified three proteins comprising an YkuD L,D-transpeptidase domain (PF03734) with a conserved [S/T]xGCh[R/N] catalytic domain, in which C is the Cys nucleophile, x any residue, and h a hydrophobic residue (Supplementary Fig. S2). The function of these enzymes, designated Ldt_{Pae1} , Ldt_{Pae2} , and

Ldt_{Pae3}, was investigated by expressing the corresponding genes in a derivative of *E. coli* BW25113 obtained by deletion of the complete set of the six *E. coli ldt* genes (26), hereafter designated as *E. coli* $\Delta 6ldt$.

The peptidoglycan of *E. coli* $\Delta 6ldt$ used for heterospecific *ldt* gene expression contained two main mucopeptides, a tetrapeptide monomer and a 4→3 cross-linked Tetra→Tetra dimer formed by PBPs. Expression of *P. aeruginosa ldt*_{Pae1} led to the formation of two additional 3→3 cross-linked dimers containing a tripeptide donor stem and a tripeptide or a tetrapeptide acceptor stem (Tri→Tri and Tri→Tetra dimers; mucopeptides 4 and 6 in Fig. 2B; Table 1). These results indicate that Ldt_{Pae1} is functional in *E. coli* and acts as a peptidoglycan cross-linking enzyme in this host.

Heterospecific expression of genes encoding Ldt_{Pae2} in *E. coli* $\Delta 6ldt$ led to the formation of an additional disaccharide-tripeptide monomer substituted by the dipeptide Lys-Arg (KR; mucopeptide 3 in Fig. 2B; Table 1). This observation indicates that Ldt_{Pae2} catalyzes the anchoring of Lpp despite the sequence divergence between the sequence of the *E. coli* (Lpp) and *P. aeruginosa* (Opr1) lipoproteins (24.8% identity) (Supplementary Fig. S1).

Heterospecific production of Ldt_{Pae3} in *E. coli* $\Delta 6ldt$ did not lead to any modification of the mucopeptide profile. Thus, Ldt_{Pae3} did not catalyze formation of 3→3 cross-links or the anchoring of the Braun lipoprotein in *E. coli*.

Table 1. Muropeptide composition of peptidoglycan extracted from derivatives of *E. coli* $\Delta 6ldt$ expressing *P. aeruginosa* L,D-transpeptidase genes

Muropeptide (cross-link)	Calculated mass ^a	Observed mass ^a			
		None	<i>ldt</i> _{Pae1}	<i>ldt</i> _{Pae2}	<i>ldt</i> _{Pae3}
Monomers					
Tri	870.371	870.372	870.371	870.370	870.371
Tetra	941.408	941.408	941.409	941.408	941.409
Tri→KR	1,154.567	ND	ND	1,154.567	ND
Dimers					
Tri→Tri (3→3)	1,722.731	ND	1,722.730	ND	ND
Tetra→Tri (4→3)	1,793.768	ND	1,793.765	1,793.765	ND
Tri→Tetra (3→3)	1,793.768	ND	1,793.765	ND	ND
Tetra→Tetra (4→3)	1,864.805	1,864.805	1,864.800	1,864.803	1,864.800

^a Monoisotopic mass.

ND, not detected.

Data are representatives of three biological repeats.

Deletion of *P. aeruginosa* *ldt* genes confirms the function of *Ldt*_{Pae1}, *Ldt*_{Pae2}, and *Ldt*_{Pae3} inferred from heterospecific gene expression. Deletion of *ldt*_{Pae1} abolished the formation of 3→3 cross-linked dimers, indicating that *Ldt*_{Pae1} is the only peptidoglycan cross-linking L,D-transpeptidase produced by *P. aeruginosa* PA14 (Table 2). Deletion of *ldt*_{Pae2} alone abolished OprI anchoring indicating that *Ldt*_{Pae2} is the only enzyme responsible for the anchoring of that lipoprotein. In comparison with the parental strain, deletion of *ldt*_{Pae3} did not result in any modification of the muropeptides. Deletion of the three *ldt* genes abolished both the formation of 3→3 cross-links and the anchoring of the Lpp lipoprotein. Deletion of the *oprI* gene prevented formation of muropeptide 3 (Tri→KR; $M_{cal} = 1,154.567$), confirming that this muropeptide exclusively originates from anchoring of OprI to peptidoglycan. Together, these results (Table 2) indicate that formation of 3→3 cross-linked dimers and lipoprotein anchoring is mediated by *Ldt*_{Pae1} and *Ldt*_{Pae2}, respectively, whereas *Ldt*_{Pae3} catalyzes neither reaction, in agreement with the analysis of heterospecific expression of *P. aeruginosa* *ldt* genes in *E. coli* $\Delta 6ldt$ (above, Table 1).

Table 2. Muropeptide composition of the peptidoglycan of derivatives of strain PA14 harboring various deletions

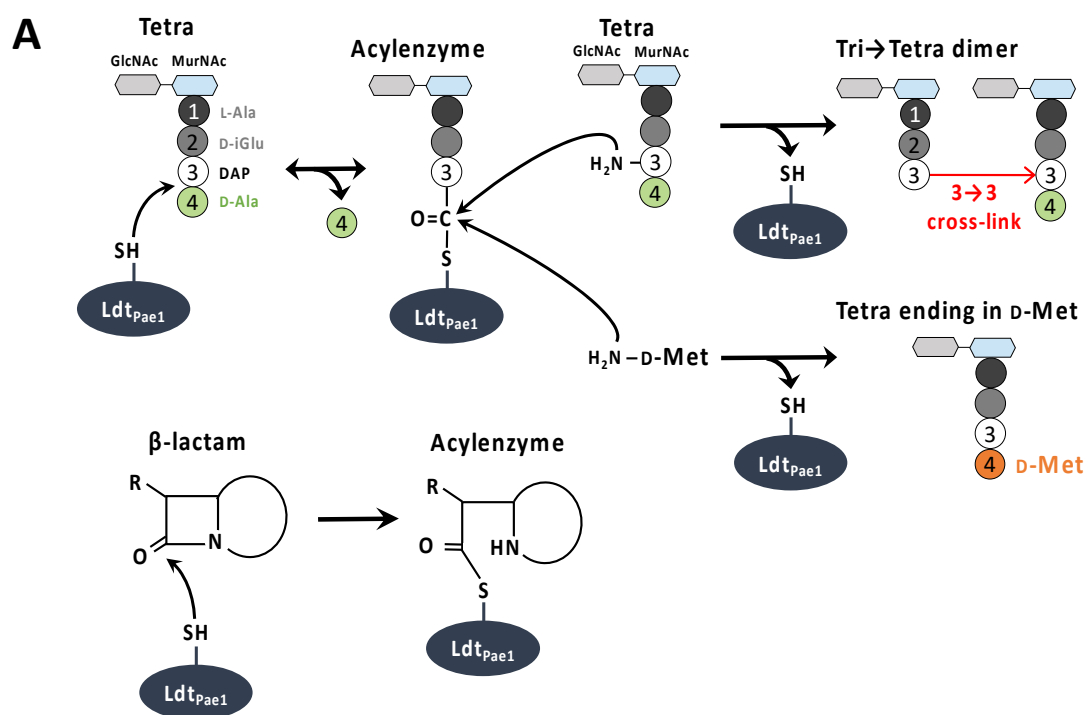
Muropeptide (cross-link)	Calculated mass ^a	Observed mass ^a of muropeptides for indicated deletions					
		None	Δldt_{Pae1}	Δldt_{Pae2}	Δldt_{Pae3}	Δldt_{Pae1} Δldt_{Pae2} Δldt_{Pae3}	$\Delta oprI$
Monomers							
Tri	870.371	870.370	870.369	870.371	870.370	870.374	870.364
Tetra	941.408	941.407	941.406	941.406	941.408	941.412	941.405
Tri→KR	1,154.567	1,154.566	1,154.565	ND	1,154.565	ND	ND
Dimers							
Tri-Tri (3→3)	1,722.731	1,722.731	ND	ND	ND	ND	ND
Tetra-Tri (4→3)	1,793.768	1,793.766	1,793.764	ND	1,793.767	ND	1,793.761
Tri-Tetra (3→3)	1,793.768	1,793.764	ND	1,793.764	1,793.766	ND	1,793.763
Tetra-Tetra (4→3)	1,864.805	1,864.802	1,864.801	1,864.799	1,864.804	1,864.818	1,864.800

^a Monoisotopic mass.

ND, not detected.

Data are representatives of three biological repeats except for strain $\Delta oprI$ (two repeats).

Purified Ldt_{Pae1} catalyzes the formation of 3→3 cross-linked dimers. In order to validate the catalytic activity of Ldt_{Pae1}, we produced a soluble fragment of Ldt_{Pae1} lacking the membrane anchor (residues 1 to 32) in *E. coli* and purified by metal affinity and size-exclusion chromatography. Consistent with our previous results, Ldt_{Pae1} was functional in the formation of 3→3 cross-linked dimers using tetrapeptide-containing peptidoglycan fragments as substrates (Fig. 3). The purified protein also catalyzed the exchanges of D-Ala⁴ of these substrates by D-Met. Ldt_{Pae1} formed covalent links with β -lactams representative of the cephem (ceftriaxone) and carbapenem (meropenem) classes but not with the penam ampicillin. This β -lactam specificity was previously observed for LDTs from various bacteria (9–13, 41). We could not similarly investigate the catalytic activity of Ldt_{Pae2} and Ldt_{Pae3} since we did not succeed in purifying these proteins.



B Products of the reactions catalyzed by purified Ldt_{Pae1}

Substrate	Product	Mass	
		Calculated	Observed
Tetra	Tri→Tetra	1,793.77	1,793.82
Lactoyl-Tetra	Lactoyl-Tri→Lactoyl-Tetra	977.42	977.52
Tetra + D-Met	Tetra ending in D-Met	1,001.41	1,001.39
Lactoyl-Tetra + D-Met	Lactoyl-Tetra ending in D-Met	593.24	593.32
Ampicillin	None	NA	NA
Ceftriaxone	Acylenzyme	36,698.7	36,699.2
Meropenem	Acylenzyme	36,686.5	36,686.9

Figure 3. Functional characterization of purified Ldt_{Pae1}. (A) Schematic representation of the reactions catalyzed by Ldt_{Pae1}. (B) Identification of the reaction products by low-resolution mass spectrometry. The indicated masses are monoisotopic masses for peptidoglycan fragments and average masses for acyl-enzymes. Tetra, reduced disaccharide-tetrapeptide, Lactoyl-Tetra, tetrapeptide linked to the D-lactoyl moiety of MurNAc following cleavage of the ether bond internal to MurNAc. D-Met, D-methionine. None, no reaction product obtained by incubation of purified Ldt_{Pae1} with ampicillin. The calculated mass of the native protein is 36,303 Da, corresponding to residues 32 to 347 fused to the MGSSHHHHHSSG His-Tag. The N-terminal methionine was not present in purified Ldt_{Pae1}.

Ldt_{Pae1} cannot bypass β -lactam-inhibited PBPs. We have previously shown that overproduction of the YcbB L,D-transpeptidase and of the (p)ppGpp alarmone in *E. coli* results in high-level β -lactam resistance due to bypass of the D,D-transpeptidase activity of PBPs (7). To determine whether Ldt_{Pae1} could replace YcbB for peptidoglycan cross-linking, we introduced recombinant plasmids encoding YcbB, YnhG, and Ldt_{Pae1} in an *E. coli* host producing the RelA' synthetase for unregulated (p)ppGpp synthesis (Table 3). Production of *E. coli* YnhG and of *P. aeruginosa* Ldt_{Pae1} did not mediate β -lactam resistance in this host even though both proteins are functional LDTs for synthesis of 3 \rightarrow 3 peptidoglycan cross-links *in vitro* and in *E. coli*. Thus, YnhG and Ldt_{Pae1} were unable to polymerize a functional peptidoglycan under conditions in which the D,D-transpeptidase activity of PBPs is inhibited by β -lactams.

Table 3. Expression of L,D-transpeptidase-mediated resistance in (p)ppGpp-producing *E. coli* ^a

Plasmid	Inhibition zone (mm) around disks containing β -lactams	
	Ceftriaxone (30 μ g)	Ampicillin (10 μ g)
pHV6 (vector)	37	23
pHV6(<i>ycbB</i>)	12	≤ 6
pHV6(<i>ynhG</i>)	38	21
pHV6(<i>Ldt_{Pae1}</i>)	39	20

^a The *E. coli* host harbored a chromosomal deletion of *relA* and plasmid pKT8 encoding RelA'. Data are the medians from three biological repeats.

The activity of β -lactams and the motility of *P. aeruginosa* are not affected by deletions of *ldt* genes. The activity of 31 antibiotics, including 20 β -lactams, was tested by the disk diffusion assay against *P. aeruginosa* PA14 and isogenic derivatives obtained by deletion of L,D-transpeptidase genes (Supplementary Table S3). Deletion of *Ldt_{Pae1}*, *Ldt_{Pae2}* plus *Ldt_{Pae3}*, or of the three L,D-transpeptidase genes did not affect the susceptibility of *P. aeruginosa* to any of the tested antibiotics. Thus, the L,D-transpeptidases did not contribute to growth of PA14 in

the presence of sub-inhibitory concentrations of β -lactams or to the efficacy of the permeability barrier mediated by the outer membrane.

Deletion of *Idt_{Pae2}* destabilizes the *P. aeruginosa* envelope. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) is often used to probe the stability of the outer membrane of *E. coli* since this compound prevents the stabilization of the outer leaflet of the outer membrane by Mg^{2+} cations (30, 42). Incubation of *P. aeruginosa* PA14 derivatives lacking *oprI* or *Idt_{Pae2}* resulted in similar kinetics of bacterial killing by EDTA with *ca.* 6 \log_{10} decreases of the initial inoculum (Fig. 4). Deletion of *Idt_{Pae1}* or of *Idt_{Pae3}* had no impact on killing in comparison to wild-type PA14 with < 2 \log_{10} decreases of the initial inoculum. Thus, loss of OprI or of the anchoring of this lipoprotein to the peptidoglycan destabilizes the cell envelope leading to cell death in the presence of EDTA.

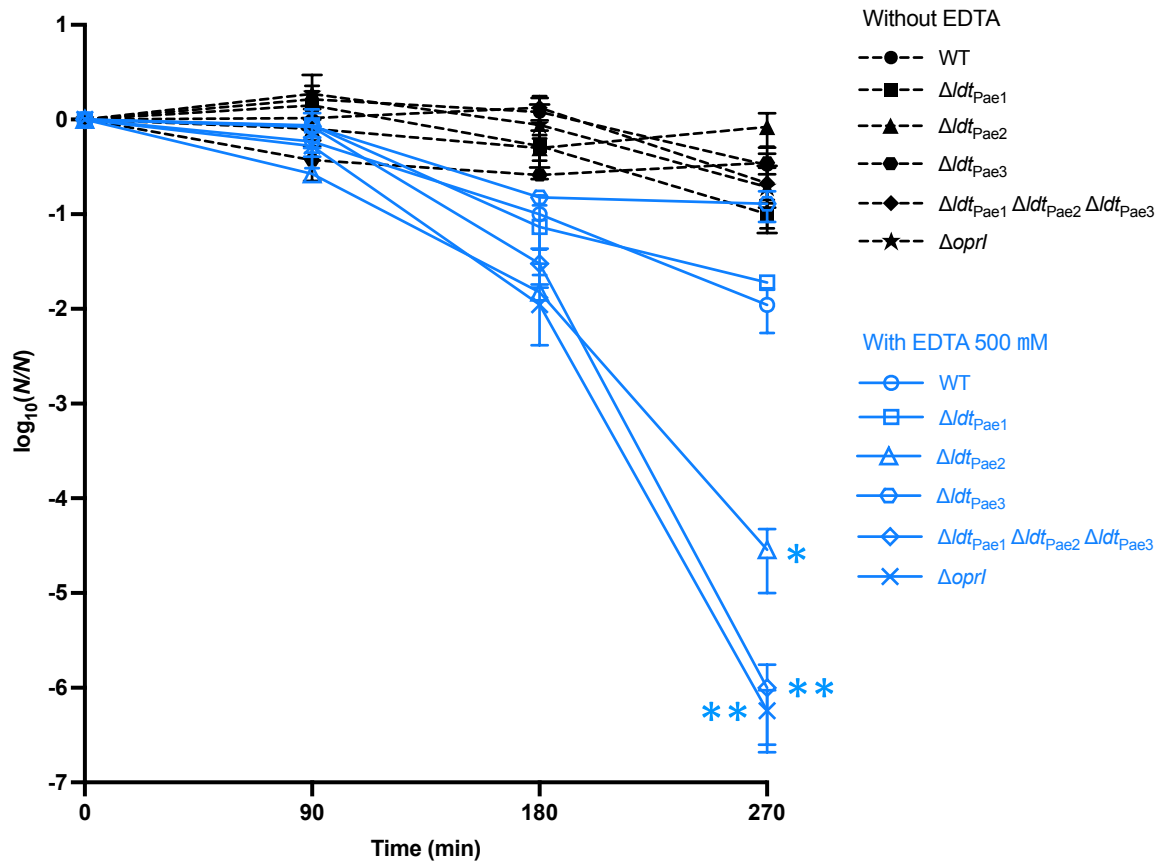


Figure 4. Killing of *P. aeruginosa* by EDTA. Bacteria from overnight cultures were resuspended in Tris-HCl pH 8.0 and incubated with 500 μ M EDTA (open blue symbols and solid lines) or without EDTA (closed black symbols and dotted lines). Bacteria were enumerated at 0, 90, 180, and 270 min. Data are the mean \pm standard error of the mean from three independent biological repeats. * and **, $P < 0.05$ and $P < 0.01$; Brown-Forsythe and Welch ANOVA (wild-type with EDTA versus mutants with EDTA at 270 min).

Deletion of *ldt* genes impairs biofilm formation. Screening of a library of mutants obtained by random insertions of a transposon previously revealed that a member of the LDT family (YafK) is required for biofilm formation by an enteroaggregative strain of *Escherichia coli* (43). This prompted us to determine the impact of *ldt* deletions on biofilm formation by *P. aeruginosa*.

Our first objective was to evaluate the contribution of LDTs to peptidoglycan synthesis in biofilm (Supplementary Table S2 and Fig. 5). The proportion of 3→3 cross-linked dimers among all dimers was 11.3%, whereas 3→3 cross-links were not detected for exponential growth of PA14 in planktonic form (Fig. 5B). The relative proportion of dimers among all muropeptides was higher in biofilm than in planktonic cultures (44.2% *versus* 33.9%) (Fig. 5A). These results indicate that growth in biofilm favors peptidoglycan cross-linking by Ldt_{Pae1} and that this growth condition was associated with a highly cross-linked peptidoglycan. Growth in biofilm also favored the anchoring of OprI to peptidoglycan indicating that Ldt_{Pae2} was active in this growth condition (Fig. 5C).

Our second objective was to determine whether the activity of the LDTs modulate biofilm formation. The deletion of *ldt_{Pae1}*, *ldt_{Pae2}*, *ldt_{Pae3}*, or *oprI* resulted in statistically significant but limited decreases in the capacity of *P. aeruginosa* PA14 to form biofilm in the 96-well plate assay (Fig. 5D). The combine deletions of all three L,D-transpeptidases did not further decrease biofilm formation. Additionally, we also demonstrated that deletions of *ldt* genes or of *oprI* had no impact on the swimming motility of PA14, a biofilm-related function, (Supplementary Table S4) indicating that the cell envelope of the mutants was fully compatible with the assembly of a functional flagellum.

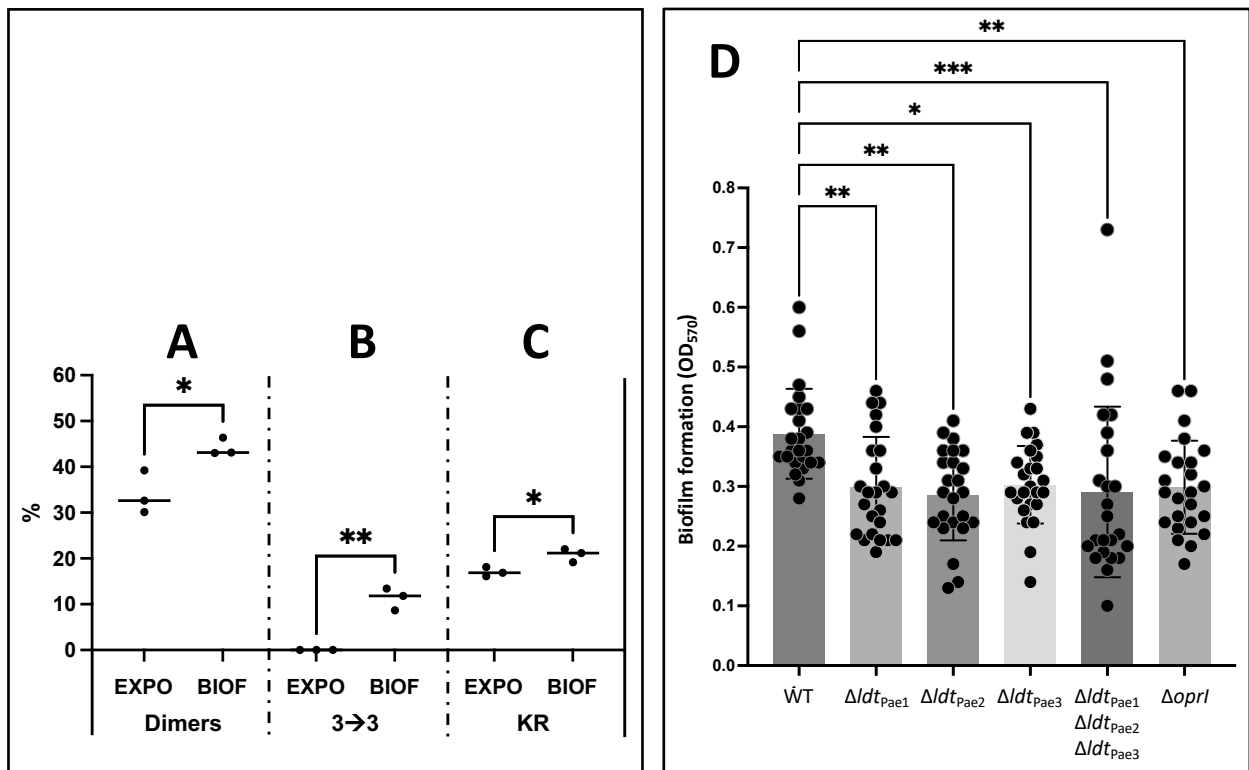


Figure 5. Peptidoglycan structure of *P. aeruginosa* grown in biofilm and impact of *ldt* gene deletion on biofilm formation. (A) Proportion of dimers with 3→3 cross-links among all dimers (cumulative area of peaks 4+6 / cumulative area of peaks 4+5+6+7 in *rp*HPLC chromatograms; $\lambda=205$ nm). **(B)** Proportion of dimers among all mucopeptides except peak 3 (peaks 4+5+6+7 / peaks 1+2+4+5+6+7). **(C)** Proportion of mucopeptides containing the Lys-Arg fragment of OprI among all mucopeptides (peak 3 / peak 1+2+3+4+5+6+7). Closed circles indicate the values obtained for biological repeats (n=3). The horizontal line indicates the mean % value. * and **, $P < 0.05$ and $P < 0.01$; unpaired t-test. BIOF, PA14 grown for 96 h in biofilm; EXPO, exponentially growing PA14 in planktonic form ($OD_{600} = 0.8$). **(D)** Crystal violet staining of biofilms formed by wild-type *P. aeruginosa* PA14 and derivatives obtained by deletion of *ldt* genes and *oprI*. Circles indicate values obtained for biological repeats (n=24). *, **, and ***, P smaller than 0.05, 0.01, and 0.001, respectively; Brown-Forsythe and Welch ANOVA test.

Comparison of LDTs catalyzing various reactions. A peptidoglycan cross-linking activity was assigned to Ldt_{Pae1} , a lipoprotein anchoring activity to Ldt_{Pae2} , and neither activity to Ldt_{Pae3} (above, Tables 1 and 2). The resulting extension in the number of functionally characterized

LDTs prompted us to explore the phylogenetic relationships between members of this protein family (Supplementary Table S5 and Supplementary Fig. S2 and S3). Closely related species were found to produce the same number of closely related LDTs, which share sequence identity over the entire sequences [e.g. *E. coli* and *Salmonella enterica* (6 paralogues), *E. faecalis* and *E. faecium* (1 paralogue), *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium abscessus* (6 paralogues)]. More distantly related species, such as *E. coli* and *P. aeruginosa* or *E. faecium* and *S. aureus* (which does not harbor any LDT) produce various numbers of LDTs (0 to 6) and the domain composition is not conserved (Supplementary Fig. S4).

We then evaluated whether LDTs catalyzing similar reactions could be identified based on the presence of specific sequence signatures. Winkle *et al.* identified a polymorphism in the conserved catalytic motif of *E. coli* LDTs (SxGChR *versus* SxGChA) and proposed that the latter motif was specific of enzymes hydrolyzing the amide bond connecting tripeptide stems to lipoproteins [YafK also referred to DpaA in *E. coli*, (32, 33). Ldt_{Pae3} might be involved in the releasing of anchored OprI in *P. aeruginosa* since this L,D-transpeptidase contains an SxGChA motif and is closely related to YafK (Supplementary Table S5 and Supplementary Fig. S2 and S3). Ldt_{Pae2} (OprI anchoring) belonged to a lineage that included both *E. coli* Lpp anchoring (ErfK, Ybis, and YcfS) and peptidoglycan cross-linking (YnhG) enzymes. For Ldt_{Pae1} (formation of 3→3 cross-links), the highest levels of identity were observed with YciB from *B. subtilis* (35.6%; unknown function), Ldt_{Mab3} from *Mycobacterium abscessus* (32.9%; unknown function), and YcfS of *Campylobacter jejuni* and *E. coli* (31.2% and 30.1 %, unknown and Lpp anchoring respectively). Together, these results imply that LDTs with lipoprotein anchoring and 3→3 cross-linking activities cannot be assigned to two evolutionary divergent lineages.

Ldt_{Pae1} comprises two YkuD domains. Sequence comparison indicated that Ldt_{Pae1}, which catalyzes the formation of 3→3 peptidoglycan cross-links, comprises an N-terminal *bona fide* LDT catalytic domain with the conserved catalytic motif (SHGCIR) followed by a related domain that lacks the catalytic Cys residue (QLGKIR) (these domains are designated Ldt_{Pae1} and Ldt_{Pae11} respectively in Supplementary Table S5 and Supplementary Fig. S2 and S3, and YkuD1 and YkuD2 in Supplementary Fig. S4). These two domains are clustered in the same lineage suggesting a duplication. This domain architecture has not been detected in any other LDT sequence. The role of the catalytically deficient domain Ldt_{Pae11} remains to be determined. It is tempting to speculate that it could be involved in peptidoglycan binding, a function mediated by unrelated domains in other LDTs (44, 45).

DISCUSSION

Active-site cysteine L,D-transpeptidases comprising a conserved YkuD domain catalyze various reactions (Fig. 1 and Introduction section) (46). Here we show that *P. aeruginosa* may produce representatives of each of the three catalytic functions associated with the conserved YkuD catalytic domain, namely, the formation of 3→3 peptidoglycan cross-links (Ldt_{Pae1}), the anchoring of lipoprotein OprI to PG (Ldt_{Pae2}), and the hydrolysis of the resulting tripeptide→OprI amide bond (Ldt_{Pae3}). The activity of these enzymes was investigated by *in vitro* assays for purified Ldt_{Pae1} (Fig. 3), deletion of *ldt* genes from the chromosome of *P. aeruginosa* PA14 (Table 2), and heterologous expression of *ldt* genes in *E. coli* (Table 1). Functionality of Ldt_{Pae1} and Ldt_{Pae2} in the heterologous host might be accounted for by the conserved structures of both the peptidoglycan subunit of *P. aeruginosa* and *E. coli* (Fig. 2) and the Arg-Lys C-terminus of lipoproteins OprI and Lpp (Supplementary Fig. S1). The function of Ldt_{Pae3} was tentatively assigned to the release of OprI based both on the absence of detectable amide bond forming activity (formation of 3→3 and tripeptide→ OprI bonds) and on the close similarity between Ldt_{Pae3} and *E. coli* hydrolase YafK.

Phylogenetic analysis revealed that the number of LDTs and their domain composition are not conserved except in closely related bacteria belonging to the same genus (Supplementary Table S5 and Supplementary Fig. S2, S3, and S4). LDTs with lipoprotein anchoring and 3→3 cross-linking activities cannot be assigned to two distinct evolutionary lineages. Thus, although *ldt* genes appear to belong to bacterial core genomes, they are not stably inherited in distantly related lineages. In contrast, comparison of high molecular-weight PBPs involved in peptidoglycan cross-linking clearly identifies orthologues in distantly related lineages (47).

The phenotypic impact of deletions of *ldt* genes and of *oprI* has been explored using various assays. The deletion of these genes did not result in hyper-susceptibility to antibiotics or impaired motility (Supplementary Tables S3 and S4, respectively). These observations indicate that the permeability barrier of the outer membrane and the functionality of the flagellum were preserved in the mutants. Loss of OprI or of the anchoring of this lipoprotein to PG led to a destabilization of the cell envelope, as revealed by the bactericidal effect of EDTA (Fig. 4). In contrast, formation of 3→3 cross-links by Ldt_{Pae1} was dispensable for survival in the presence of EDTA. Similar results were previously obtained for mutants of *E. coli* deficient in the production of Lpp or in the anchoring of this lipoprotein to peptidoglycan (30).

Formation of 3→3 cross-links remained undetected for exponential growth of *P. aeruginosa* PA14 in planktonic form (Fig. 5B). The proportion of 3→3 cross-links was significantly higher (11.3%) for growth in biofilm ($P < 0.01$). Deletion of *ldt*_{Pae1} had a modest but significant ($P < 0.05$) impact on the ability of *P. aeruginosa* PA14 to form biofilms (Fig. 5D). These results indicate that 3→3 cross-linking of glycan strands participates in the adaptation of peptidoglycan metabolism to conditions that prevail in biofilm. Interestingly, mucopeptides containing 3→3 cross-links were found to be more abundant in *P. aeruginosa* epidemic strains than in reference strains PAO1 and PA14 (40). In addition, deletion of *ldt*_{Pae2} or *oprI* impaired biofilm formation and sensitized mutants to EDTA. Thus, L,D-transpeptidases might be actionable targets to fight against bacteria in biofilm. Considering the impact of *ldt* gene deletions on the bactericidal activity of EDTA (Fig. 4), it would be relevant to determine whether inhibition of LDTs of Gram-negative bacteria could act in synergy with drug-EDTA associations for the eradication of catheter-associated biofilms based on antibiotic lock therapy or in treatment of other biofilm-related infections (48–50).

METHODS

Bacterial strains and plasmids. The characteristics and origin of plasmids and bacterial strains are listed in Supplementary Tables S6 and S7, respectively.

Cultures for peptidoglycan extraction. For the analyses of the muropeptide composition of the peptidoglycan from *P. aeruginosa* PA14 and derivatives obtained by deletion of *Idt* genes and *oprI*, bacteria were grown overnight to the stationary phase in 200 ml Lysogeny (Miller) broth (LB) at 37°C. For quantitative analyses of the peptidoglycan of *P. aeruginosa* PA14 in the exponential phase of growth, bacteria were grown in 1 L of LB broth and collected at an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.8. For quantitative analyses of the peptidoglycan of *P. aeruginosa* PA14 grown in biofilm, continuous-flow biofilm microfermentors containing a removable glass spatula were used as described previously (51). Biofilm microfermentors were inoculated by placing the spatula in a culture solution adjusted to an OD₆₀₀ of 1.0 (ca. 5.0×10^8 bacteria/mL) for 5 min. The spatula was placed into the microfermentor and biofilm culture was performed at 37° C in Miller LB broth. Flow rate was adjusted so that total time for renewal of microfermentor medium was shorter than bacterial generation time, thus minimizing planktonic growth by constant dilution of non-biofilm bacteria. Biofilms were allowed to grow on the glass spatula for 72 h after which the microfermentor was vortexed for 1 minute to resuspend the bacterial population. The resulting bacterial suspension (50 mL) was centrifuged 15 min at 7,000 x *g* (4 °C) and peptidoglycan was extracted by the hot SDS procedure.

Analysis of peptidoglycan structure. Sacculi were extracted by the hot SDS procedure and treated with pronase and trypsin (52, 7). Muropeptides were solubilized by digestion with muramidases, reduced with NaBH₄, and purified by *rp*HPLC. The mass of muropeptides was

determined on a Bruker Daltonics maXis high resolution mass spectrometer (Bremen Germany) operating in the positive mode, as previously described (53, 54).

Heterospecific expression of *P. aeruginosa* *ldt* genes in *E. coli* BW25113 $\Delta 6ldt$. Genes *ldt*_{Pae1}, *ldt*_{Pae2}, and *ldt*_{Pae3} were cloned into the vector pHV6 under the control of the *trc* promoter by Gibson assembly. Genes encoding LDTs were induced at OD₆₀₀ = 0.2 with 100 μ M of isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside in LB broth. The incubation was continued for 18 h at 37 °C.

Purification of Ldt_{Pae1}. A fragment of the Ldt_{Pae1} encoding residues 33 to 347 of the L,D-transpeptidase was cloned into the vector pET-TEV generating a translational fusion with a C-terminal 6 x His tag. The protein was produced in *E. coli* BL21 and purified from a clarified lysate by metal affinity and size exclusion chromatography as previously performed for L,D-transpeptidase YcbB from *E. coli* (7). Protein concentration was determined by the BioRad assay using bovine serum albumin as the standard.

Peptidoglycan transpeptidase activity of purified Ldt_{Pae1}. Reduced disaccharide-tetrapeptide and lactoyl-tetrapeptide were extracted from the peptidoglycan of *E. coli* BW25113 $\Delta 6ldt$ as previously described (55). Purified Ldt_{Pae1} (5 μ M) was incubated with peptidoglycan fragments (50 μ M) in 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) at 20 °C. LC/MS was performed with a nucleoshell RP 18 column (5 μ M; 50 x 2 mm) coupled to a low-resolution LCQ Advantage mass spectrometer (ThermoElectron). The reactions were also carried out in the presence of additional D-Met (1 mM).

Mass spectrometry analyses of Ldt_{Pae1} acylation by β -lactams. The formation of drug-enzyme adducts was tested by incubating Ldt_{Pae1} (10 μ M) with β -lactams (100 μ M) at 20 °C in 5 mM Tris-HCl (pH 8.0) (9). Five microliters of acetonitrile and 1 μ l of 1% formic acid were added, and the reaction mixture was directly injected into the mass spectrometer. Spectra were

acquired in the positive mode on a Bruker Daltonics maXis high resolution mass spectrometer (Bremen Germany) operating in the positive mode.

Deletion of genes *ldt*_{Pae1}, *ldt*_{Pae2}, *ldt*_{Pae3}, and *oprI* of *P. aeruginosa* PA14. The two-step allelic exchange procedure was used for deleting *ldt* genes and *oprI* (56). Briefly, sequences flanking the genes were cloned into the vector pEX18. The plasmids were transferred by conjugation from *E. coli* S17 λ pir to *P. aeruginosa* PA14. Transconjugants were selected on LB agar plates containing 15 μ g/mL triclosan and 75 μ g/ml tetracycline. Colonies were subcultured in salt free LB containing 5% sucrose. The genome of the mutants was sequenced by the Illumina approach (Novogene, Cambridge UK).

Antimicrobial susceptibility testing. Antibigrams were performed by the disk diffusion assay in cation-adjusted Muller Hinton agar plates according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines (57).

Bactericidal activity of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Bacteria were grown overnight to the stationary phase in LB (Miller) broth at 37° C, washed twice in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), and resuspended in the same buffer to a final OD₆₀₀ of 0.9. EDTA was added (final concentration of 500 μ M), bacteria were incubated in 2-ml Eppendorf tubes at 37° C, and samples were withdrawn at 90 min, 180 min, and 270 min for viable cell counts on agar plates.

Plate-based assay for swimming motility. An isolated colony from an overnight agar plate was inoculate onto a soft agar plate containing tryptone broth (10 g/L), NaCl (5 g/L), and agar (0.3% W/V) (58). Plates were incubated 18 h at 30° C and the swimming diameter was recorded.

Quantification of biofilm. Formation of biofilm was determined with crystal violet staining in 96-well microtiter plates, as previously described (59). A microtiter plate was inoculated with 100 μ l of overnight cultures at a dilution of 1:100 and incubated at 37 °C for 24 h. The medium

was removed and the wells were washed twice with water. 125 μ l of a crystal violet solution (RAL Diagnostics) was added to each well and the incubation was continued for 15 min. After washing three times with water, 125 μ l of a mixture ethanol and acetone (80/20; V/V) was added and incubation was continued for 10 min. Absorbance was measured at 570 nm with a plate reader (Tecan infinite 200Pro).

Statistical analysis. The data were analyzed using GraphPad Prism version 9 (La Jolla, CA, USA). An unpaired t-test was performed to analyze the relative abundance of dimers and 3 \rightarrow 3 cross-links in the peptidoglycan of *P. aeruginosa* PA14. A Brown-Forsythe and Welch ANOVA test was performed to analyze the impact of *ldt* gene deletions on bacterial killing by EDTA and the quantification of biofilm formation. A $P < 0.05$ was considered statistically significant in both types of tests.

Sequence comparison and phylogeny. Forty YkuD-related domains were retrieved from the genome of 12 bacterial species including *E. coli* (*E. coli*_YcfS, *E. coli*_YcbB, *E. coli*_YnhG, *E. coli*_Ybis, *E. coli*_ErfK, and *E. coli*_YafK), *P. aeruginosa* (Ldt_{Pae1} and its second YkuD domain named Ldt_{Pae11}, Ldt_{Pae2}, and Ldt_{Pae3}), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Sty_YcfS, Sty_YcbB, Sty_YnhG, Sty_Ybis, Sty_ErfK, and Sty_YafK), *Campylobacter jejuni* (Cje_YcfS and Cje_Ybis), *Neisseria meningitidis* (Ldt_{Nme}), *Bacillus subtilis* (Bs_YkuD, Bs_YqjB, and Bs_YciB), *Clostridioides difficile* (Ldt_{Cd1}, Ldt_{Cd2}, and Ldt_{Cd3}), *Mycobacterium tuberculosis* (Ldt_{Mt1-6}), *Mycobacterium abscessus* (Ldt_{Mab1-6}), *Enterococcus faecium* (Ldt_{fm}), *Enterococcus faecalis* (Ldt_{fs}), and *Coxiella burnettii* (Ldt_{Cbu2}). The sequences of the domains were aligned using Clustal Omega (Supplementary Fig. S2) providing the identity matrix reported in Supplementary Table S5. The phylogram reported in Supplementary Fig. S3 was obtained on iTOL (60).

ACKNOWLEDGEMENTS

High-resolution mass spectra were obtained at the Plateforme de Spectrométrie de Masse Bio-organique of the Muséum d'Histoire Naturel. This work was supported by the the French National Research Agency (ANR), (grant n°ANR-19-CE15-0006-01 "PeptidoAdapt", Programme AAPG 2019 to MA and JM G). This work was also supported by the French government's Investissement d'Avenir Program, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant n°ANR-10-LABX-62-IBEID). S.T.-R was supported by the French National Research Agency (ANR), project EvoIToLAB (ANR-18-CE13-0010). We thank A Filloux for the generous gift of *P. aeruginosa* mutants obtained by transposon insertion (full library available on <http://ausubellab.mgh.harvard.edu/cgi-bin/pa14/home.cgi>).

Supplementary Table S1. Muropeptide profile of peptidoglycan extracted from a stationary phase culture of *P. aeruginosa* strain PA14

Fraction	RT		Integration		ppm	Intensity	Structure
	(min)		(mAU.ml)	Mass obs			
F3	22.96		6.1	518.232	NA	5,600	Unkown
F4	22.96		6.1	870.371	870.371	-0.5	147,000 GMr-Tri
F5	24.41		1.6	976.383	976.386	2.1	22,000 GM-GMr (tetrasaccharide)
F6	25.33		2.4	738.328	738.328	0.2	69,000 Mr-Tetra
F9	27.86		27.6	941.406	941.408	2.1	215,000 GMr-Tetra
				998.463	998.466	2.6	18,000 GMr-Tri→K
F14	33.62		2.9	1154.566	1154.567	0.9	35,000 GMr-Tri→KR
				939.390	939.392	1.9	9,000 GM-Tetra
				1476.645	1476.645	0.6	1,000 GM-GMr-Tri→K
				1313.572	1313.572	0.2	1,000 Tri→GMr-Tetra
F16	35.4		1.5	679.301	NA	NA	18,000 Unknown
				1384.607	1384.609	1.5	19,000 GMr-Tetra→Tetra
F17	36.6		1.5	1722.724	1722.731	3.9	6,000 GMr-Tri→GMr-Tri
				1590.685	1590.687	0.8	9,000 GMr-Tri→Mr-Tetra
F18	37.38		3.6	1793.766	1793.768	1.0	45,000 GMr-Tetra→GMr-Tri (MS/MS)
F19	38.77		2.5	1793.764	1793.768	1.8	17,000 GMr-Tri→GMr-Tetra (MS/MS)
F20	39.47		27.2	1864.802	1864.805	1.5	208,000 GMr-Tetra→GMr-Tetra (MS/MS)
F25	44.34		2.1	905.388	NA	NA	6,000 Unknown
				2788.185	2788.202	6.1	15,000 GMr-Tetra→GMr-Tetra→GMr-Tetra
F27	46.56		14.4	1860.769	1860.774	2.2	8,000 GM-Tetra→GM-Tetra
				1773.737	1773.742	2.3	1,000 GMAnh-Tetra→GMr-Tri
				1038.445	NA	NA	6,000 Unknown
				3266.38	3266.382	0.6	100 GM-GMr-Tetra→GMr-Tetra→GMr-Tetra
F29	48.73		4.4	1844.774	1844.779	2.6	35,000 GMAnh-Tetra→GMr-Tetra

Fraction *rp* HPLC fraction

RT (min) Retention time

mAU.ml Integration of the area under the absorbance curve ($\lambda=205$ nm)

Mass obs Observed monoisotopic mass

Mass cal Calculated monoisotopic mass

ppm Difference in part per million between the observed and calculated monoisotopic masses

Intensity Current intensity for the indicated mass (arbitrary unit)

Structure Structure of muropeptide. Abbreviations: GM, MurNAc-GlcNAc; Tri, tripeptide; Tetra, tetrapeptide; K and KR, Oprl residues; In dimers, polymorphism in the disaccharide is arbitrarily indicated in the donor [r, reduced; anh, anhydro; Mr, absence of GlcNAc due to glucosaminidase activity; void, absence of GlcNAc and MurNAc due to amidase activity). MS/MS, the structure of the dimers was determined by tandem mass spectrometry.

Supplementary Table S2. Muropeptide profile of peptidoglycan extracted from *P. aeruginosa* PA14 grown in biofilm

Fraction	RT		Integration		ppm	Intensity	Structure
	(min)		(mAU.ml)	Mass obs			
F1	23.76		62.9	870.366	870.371	5.1	75,000 GMr-Tri
F2	25.24		23.4	976.381	976.386	4.8	152,000 GM-GMr (tetrasaccharide)
F4	28.65		128.1	941.404	941.408	3.7	920,000 GMr-Tetra
F5	29.18		14.7	998.462	998.466	3.5	435,000 GMr-Tri→K
F6	29.93		5.1	521.231	NA	NA	165,000 Unknown
F7	30.98		7.4	1348.546	1348.550	3.6	53,000 GM-GMr-Tri
F9	34.23		13.2	1154.565	1154.567	1.7	124,000 GMr-Tri→KR
F10	34.57		9.0	1419.579	1419.588	6.3	110,000 GM-GMr-Tetra
F11	35.79		16.7	1384.601	1384.609	5.9	230,000 GMr-Tetra→Tetra
F12	37.68		8.3	1793.757	1793.768	6.1	68,000 GMr-Tetra→GMr-Tri
F13	38.42		17.2	1793.765	1793.768	1.5	90,000 GMr-Tri→GMr-Tetra
F14	39.58		118.9	1864.800	1864.805	2.7	280,000 GMr-Tetra→GMr-Tetra
F17	42.23		9.2	2342.974	2342.985	4.4	56,000 GM-GMr-Tetra→GMr-Tetra
				2077.956	2077.964	3.6	10,000 GMr-Tetra→GMr-Tri→KR
F20	44.32		9.6	1844.767	1844.779	6.4	38,000 GMAnh-Tetra→GM-Tetra
				495.195	NA	NA	56,000 Unknown
F21	46.89		11.7	1773.736	1773.742	3.4	4,000 GMAnh-Tri→GMr-Tetra or GMAnh-Tetra→GMr-Tri
				1364.580	1364.583	2.6	28,000 GMAnh-Tetra→Tetra
F22	48.77		13.6	1844.776	1844.779	1.6	100,000 GMAnh-Tetra→GM-Tetra

Fraction *rp* HPLC fraction

RT (min) Retention time

mAU.ml Integration of the area under the absorbance curve ($\lambda=205$ nm)

Mass obs Observed monoisotopic mass

Mass cal Calculated monoisotopic mass

ppm Difference in part per million between the observed and calculated monoisotopic masses

Intensity Current intensity for the indicated mass (arbitrary unit)

Structure Structure of muropeptide. Abbreviations: GM, MurNAc-GlcNAc; Tri, tripeptide; Tetra, tetrapeptide; K and KR, Oprl residues; In dimers, polymorphism in the disaccharide is arbitrarily indicated in the donor [r, reduced; anh, anhydro; void, absence of GlcNAc and MurNAc due to amidase activity).

Supplementary Table S3. Antibiotic susceptibility testing by disk diffusion assay

Disk (loading dose)	Inhibition zones (mm) for derivatives of strains of <i>P. aeruginosa</i> PA14				
	WT	Δldt_{pae1}	Δldt_{pae2} Δldt_{pae3}	Δldt_{pae1} Δldt_{pae2} Δldt_{pae3}	$\Delta oprl$
Ampicillin (10 µg)	<6	<6	<6	<6	<6
Amoxicillin (20 µg)/Clavulanic Acid (10 µg)	<6	<6	<6	<6	<6
Ticarcillin (75 µg)	26	25	25	25	26
Piperacillin (30 µg)	29	28	27	27	28
Piperacillin (30 µg)/Tazobactam (6 µg)	26	26	26	26	25
Colistin (30 µg)	<6	<6	<6	<6	<6
Cefmandole (30 µg)	<6	<6	<6	<6	<6
Cefoxitin (30 µg)	<6	<6	<6	<6	<6
Cefixime (5 µg)	<6	<6	<6	<6	<6
Cefotaxime (5 µg)	<6	<6	<6	<6	<6
Ceftazidime (10 µg)	27	27	27	26	26
Cefepime (30 µg)	34	33	32	32	31
Aztreonam (30 µg)	29	29	29	29	29
Vancomycin (5 µg)	<6	<6	<6	<6	<6
Ertapenem (10 µg)	24	24	24	25	23
Imipenem (10 µg)	34	33	34	34	34
Meropenem (10 µg)	40	42	39	42	40
Mecillinam (10 µg)	<6	<6	<6	<6	<6
Ticarcillin (75 µg)/Clavulanic Acid (10 µg)	26	26	25	26	26
Temocillin (30 µg)	<6	<6	<6	<6	<6
Tobramycin (10 µg)	28	28	27	27	28
Netilmicin (10 µg)	20	18	17	15	20
Amikacin (30 µg)	29	28	27	26	28
Nalidixic Acid (30 µg)	12	11	12	11	10
Ciprofloxacin (5 µg)	42	41	41	42	41
Norfloxacin (10 µg)	38	37	37	38	37
Erythromycin (15 µg)	11	10	11	10	12
Trimethoprim (1.25 µg)/Sulphamethoxazole (23.75 µg)	9	<6	10	<6	9
Linezolid (10 µg)	<6	<6	<6	<6	<6
Fosfomycin (200 µg)	26	25	27	25	24
Colistin (50 µg)	20	20	20	20	19

Values are the medians of three biological repeats.
<6 when bacteria grew at the contact of the disks.

Supplementary Table S4. Impact of *ldt* and *oprI* deletions on the swimming motility of *P. aeruginosa* PA14

Deletion	Swimming diameter (mm)
None	23
Δldt_{pae1}	23
$\Delta ldt_{pae2} \Delta ldt_{pae3}$	25
$\Delta ldt_{pae1} \Delta ldt_{pae2} \Delta ldt_{pae3}$	25
$\Delta oprl$	23

Values are the medians of three biological repeats.

Supplementary Table S6. 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	(53)
pET-TEV	Km ^R P _{T7} <i>lacI</i> <i>oriV</i> ColE1	(61)
<i>Recombinant plasmids for heterospecific expression of ldt_{Pae1}, ldt_{Pae2}, and ldt_{Pae3}</i>		
pIHB1	pHV6 Ω ldt _{Pae1}	This study
pIHB2	pHV6 Ω ldt _{Pae2}	This study
pIHB3	pHV6 Ω ldt _{Pae3}	This study
<i>Recombinant plasmid for protein production</i>		
pET-TEV Ω ldt _{Pae1}	Production of soluble Ldt _{Pae1}	This study
<i>Recombinant plasmids for ycbB and relA' expression</i>		
pKT8	pHV7 Ω relA'	(7)
pHV63	pHV7 Ω ycbB	(53)

Supplementary Table S7. Characteristics and origin of *P. aeruginosa* strains used in this study.

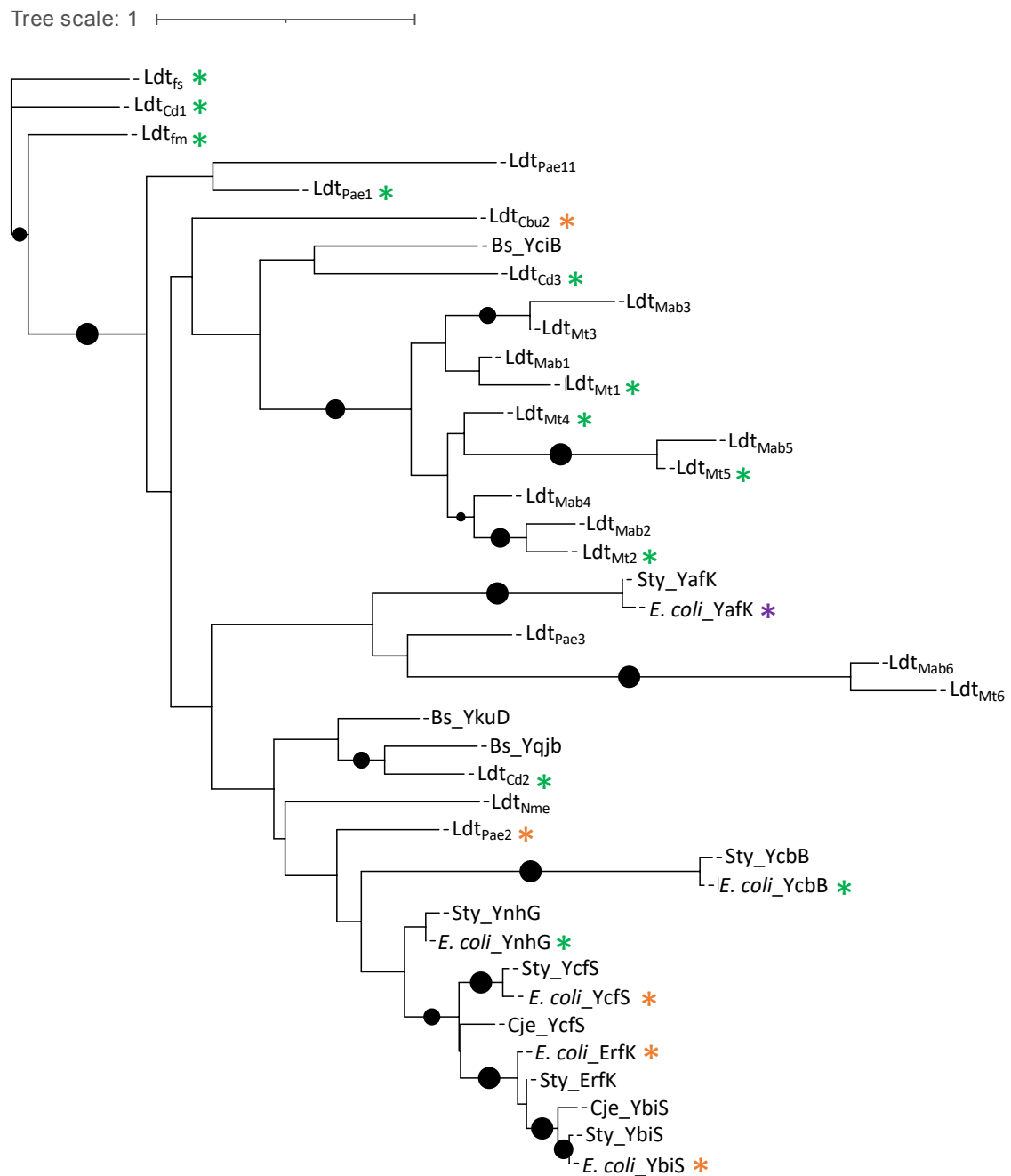
Strain	Characteristics	Origin
<i>E. coli</i> BW25113	Δ (<i>araD-araB</i>)567 Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568 Δ <i>lacZ</i> 4787 (::rrnB-3) <i>hsdR</i> 514 <i>rph-1</i>	(62)
<i>E. coli</i> BW25113 Δ 6ldt	Δ <i>ycbB</i> Δ <i>ynhG</i> Δ <i>ybiS</i> Δ <i>erfK</i> Δ <i>ycfS</i> Δ <i>yafK</i>	(26)
<i>E. coli</i> BW25113 Δ relA	Δ <i>relA</i> derivative of BW25113	(7)
<i>P. aeruginosa</i> PA14	Wild-type strain	(63)
<i>P. aeruginosa</i> PA14 Δ ldt _{Pae1}	Deletion of <i>ldt_{Pae1}</i> by MAR2xT7 transposon insertion, gentamicin ^R	(64)
<i>P. aeruginosa</i> PA14 Δ ldt _{Pae2}	Deletion of <i>ldt_{Pae2}</i> by MAR2xT7 transposon insertion, gentamicin ^R	(64)
<i>P. aeruginosa</i> PA14 Δ ldt _{Pae3}	Deletion of <i>ldt_{Pae3}</i> by MAR2xT7 transposon insertion, gentamicin ^R	(64)
<i>P. aeruginosa</i> PA14 Δ ldt _{Pae2} Δ ldt _{Pae3}	Deletion of <i>ldt_{Pae2}</i> by two-step allelic exchange in the PA14 Δ ldt _{Pae3} strain	This study
<i>P. aeruginosa</i> PA14 Δ ldt _{Pae1} Δ ldt _{Pae2} Δ ldt _{Pae3}	Deletion of <i>ldt_{Pae1}</i> by two-step allelic exchange in the PA14 Δ ldt _{Pae2} Δ ldt _{Pae3} strain	This study
<i>P. aeruginosa</i> PA14 Δ oprI	Deletion of <i>oprI</i> by two-step allelic exchange	This study

<i>E. coli</i> Lpp	MKAT-KLVLGAVILGSTLLA GCSS NAKIDQ--LS--SDVQTLN-AKVDQLSNDVNMARSDVQAAKDDAARANQRLDNMATKY- KK
<i>P. aeruginosa</i> OprI	MNNVLKFS--ALALAAVLAT GCSS HSKETEARLTATEDAAARAQARADEAYRKADEALGAAQKAQQTAEANERALRMLEKAS KK

Supplementary Figure S1. Alignment of the sequences of *E. coli* Lpp and *P. aeruginosa* OprI lipoproteins. The conserved GCSS motif and Arg-Lys C-terminus are highlighted in yellow and green, respectively.

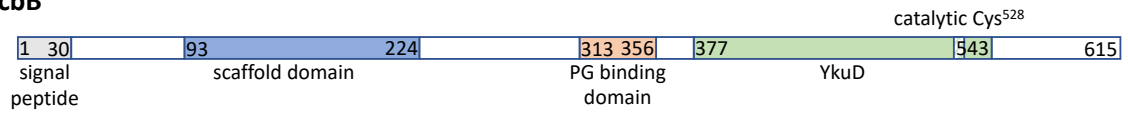
<i>E.coli_YcbB</i>	---SEAIYLHDTPNHNLF-----KRDTRAL SSGCVR VNKASDLA--NMLLQ-----	167
<i>Sty_ycbB</i>	---SDAIYLHDTPNHTLF-----QRDARAL SSGCVR VNKASELA--NMLLQ-----	168
<i>E.coli_YafK</i>	GYEGKYLMIH-----GDCV SIGCY AMTNQGIDEIFQFVTGALVFGQP	125
<i>Sty_YafK</i>	GYDGKYLMIH-----GACV SVGCY AMTDSGIDEIFQFVTAALVFGQP	125
<i>LdtPae3</i>	--AGGMIHIGTPLDDEYPE----WYFSTLDW TNGCI AMNNTDMREVSVVKDGTLLIEI-	135
<i>LdtPae2</i>	---VPGYLIHGSNKKFGI-----GTRT SHGCF RMYNADVTHLFSMISVGTSVRI-	136
<i>E.coli_ErfK</i>	---GRLYAIHGTNANFGI-----GLRV SQGCIR LRNDDIKYLFDNVPGTRVQI-	135
<i>Sty_erfK</i>	---GRLYAIHGTNANFGI-----GLRV SQGCIR LRNDDIKYLFDHVPGTRVQI-	135
<i>E.coli_Ybis</i>	---GRLYAIHGTNANFGI-----GLRV SHGCV LRNEDIKFLFEKVPVGTTRV---	131
<i>Sty_Ybis</i>	---GRLYAIHGTNANFGI-----GLRV SHGCV LRNDDIKFLFENVPVGTTRV---	131
<i>Cje_Ybis</i>	---GRLYAVHGTNANFGI-----GLRV SHGCV LRDADIKWLYDNVPGTRVQFI	136
<i>E.coli_YnhG</i>	--GNGEYLIHGTSAPDSV-----GLRV SSGCI RMNAPDIKALFSSVRTGTPVKV-	136
<i>Sty_YnhG</i>	--GNGEYLIHGTSAPDSV-----GLRV SSGCI RMNAPDIKALFAQVRTGTPVKV-	136
<i>E.coli_Ycfs</i>	--YGGVYLLHGTNADFGI-----GMRV SSGCI RLRDDDIKTLFSQVTPGTKVNI-	138
<i>Sty_ycfs</i>	--YGGVYLLHGTNADFGI-----GMRV SSGCI RLRDGDIETLFRQVTPGTKVNI-	138
<i>Cje_ycfs</i>	--GTGQYLIHGTNANFGI-----GMRV SSGCI RLRPDDIEALFNSVPKGTTRVQII	138
<i>LdNme</i>	--PKLGLGIHGTNAPASV-----PGVR SHGCV RMKSPDALEFAKTIASGSPASVI	133
<i>Bs_YkuD</i>	----QHYGIHGTNTPASI-----GKAV SKGCI RMHNKDVIELASIVPNGTRVTIN	109
<i>Ldtcd2</i>	GTYGDTYGIHGNNESSI-----GKHI SSGCI RMHNKDVRLWLFQVPGVSDVVI-	124
<i>Bs_Yqjb</i>	GTDGRIYGIHGTNREESV-----GKVF SNGCI RMHNDEVVHLFQTIIPVGTTRVLI-	124
<i>LdtMt6</i>	---VMGVNK----AKVPGKSAFFHTTDGGP TAGCVA IDDATLVQIIRWLRPGAVIAI-	178
<i>LdtMab6</i>	---VMGVNK----DRVPGGSAFFVHSTDGGP TAGCV SLDDATLVKLIWLRPGAVI---	158
<i>Ldtfs</i>	---VTQIGIHSDHKLDKYGDKEAFK--TDAG SNGCI INTPGTEVSKI F DVSYDGMPIVI-	131
<i>Ldtcd1</i>	----GNIGIH DATWRNSFGGS---IY--KSSG SHGCV NTPFPSKAKKIYENIEPGTPII--	107
<i>Ldtfm</i>	----SGVGIHSDWQPEYGGD---LW--KTRG SHGCI INTPPSVMKELFGMVEKGTVPVLVF	126
<i>LdtPae11</i>	---WSVVQVSN-P---GQGL-----TPSE QLGKI RMDPFTFVREMLGAMDVGSTLV--	99
<i>LdtCbu2</i>	---SGGNAIHGSPYI----S-----NRNT SHGCI RVYPGAAAWLSHYFMRAGTKV--	132
<i>Bs_YciB</i>	-----IKTE----AEKL-----GTKA SHGCI RLTIPDAKVVYENIPEHTKVVIS	126
<i>LdtPae1</i>	---WDGIALHA----GNLP-----GYPAS SHGCI RLPMAFAKKLYGITGFSSTTVII	111
<i>Ldtcd3</i>	-----LYDSTGSYIIDGRL-----GEAL SHGCI RLSTENAKWIYDNIPTTTTVII-	120
<i>LdtMt5</i>	---NNGEFIHANPMSAGAQQ-----NSNV TNGCI NLSTENAEQYYRS AVYGDPEV-	122
<i>LdtMab5</i>	---NNGEFIHANPNTIGQQG-----NTNV TNGCI NLSLGD AESYFRTAIYGDPEV-	121
<i>LdtMt3</i>	---SRGLYVHSAPWALPALG-----LENV SHGCI SLSREDAEWYNAVDIGDPVIV-	111
<i>LdtMab3</i>	---TRGLFVHSAPWAVPAMG-----YENV SHGCI S LPPAAA EWYFNNVNI G DPVVV-	103
<i>LdtMt1</i>	---WSGVYVHSAPWSVNSQGG-----YANV SHGCI NLS PDNAAWYF DAVTVGDPIEV-	125
<i>LdtMab1</i>	---WGGVYVHSAPWSTGAQQ-----NSNV SHGCI NLS PDNASWYNTVSI G DPPII I-	116
<i>LdtMt2</i>	---YSGVYVHSAPWSVGAQQ-----HTNT SHGCL NVSPSNAQWYFDHVKRGDIVEV-	126
<i>LdtMab2</i>	---YSGIYVHAAFPWSVGAQQ-----RTNT SHGCL NVSTANAKWYFENTKRGDVIIV-	121
<i>LdtMt4</i>	---NSGFVHSAPWSVADQG-----KRVN THGCI NLS PANAKWYFDNFGSDP VVV-	128
<i>LdtMab4</i>	---NSGIFVHAAFPWSVGAQQ-----KSDT SHGCI NVNTDNATWFFNQSHPGDPVIV-	124

Supplementary Figure S2. Multiple sequence alignment of a portion of YkuD domains comprising the conserved catalytic motif. The conserved motifs comprising the catalytic Cys nucleophile is highlighted in yellow. The consensus for this motif is SxGChR/A, where x is any residue and h is a hydrophobic residue.

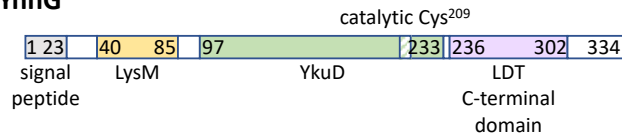


Supplementary Figure S3. Phylogram of the YkuD catalytic domains of L,D-transpeptidases. The phylogram was obtained on iTOL. Closed circles indicate bootstraps with a score greater than 95 and their size is proportional to the score. We consider that a score lower than 95 does not allow to affirm that the node between the two branches is supported. Stars indicate the function if known: green, 3→3 cross-linking; orange, lipoprotein or β-barrel protein anchoring; purple, hydrolysis of the tripeptide→lipoprotein amide bond.

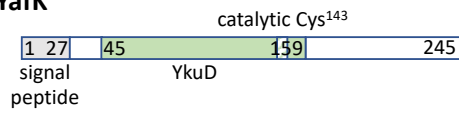
YcbB



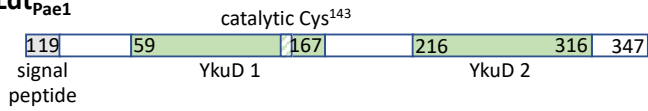
YnhG



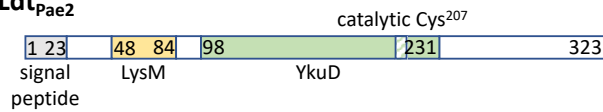
YafK



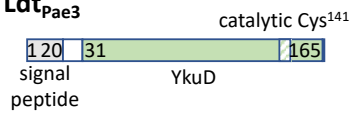
Ldt_{Pae1}



Ldt_{Pae2}



Ldt_{Pae3}



Supplementary Fig. S4. Domain architecture of relevant LDTs. Data were recovered from the InterPro data base.

REFERENCES

1. Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA. 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 32:149–167.
2. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. 2. *FEMS Microbiol Rev* 32:234–258.
3. Mainardi J-L, Fourgeaud M, Hugonnet J-E, Dubost L, Brouard J-P, Ouazzani J, Rice LB, Gutmann L, Arthur M. 2005. A Novel Peptidoglycan Cross-linking Enzyme for a β -Lactam-resistant Transpeptidation Pathway. 46. *J Biol Chem* 280:38146–38152.
4. Mainardi J-L, Legrand R, Arthur M, Schoot B, van Heijenoort J, Gutmann L. 2000. Novel Mechanism of β -Lactam Resistance Due to Bypass of DD-Transpeptidation in *Enterococcus faecium*. *Journal of Biological Chemistry* 275:16490–16496.
5. Mainardi J-L, Morel V, Fourgeaud M, Cremniter J, Blanot D, Legrand R, Fréhel C, Arthur M, van Heijenoort J, Gutmann L. 2002. Balance between Two Transpeptidation Mechanisms Determines the Expression of β -Lactam Resistance in *Enterococcus faecium*. *Journal of Biological Chemistry* 277:35801–35807.
6. Sacco E, Hugonnet J-E, Josseaume N, Cremniter J, Dubost L, Marie A, Patin D, Blanot D, Rice LB, Mainardi J-L, Arthur M. 2010. Activation of the L,D-transpeptidation peptidoglycan cross-linking pathway by a metallo-d,d-carboxypeptidase in *Enterococcus faecium*. *Molecular Microbiology* 75:874–885.
7. Hugonnet J-E, Mengin-Lecreulx D, Monton A, den Blaauwen T, Carbonnelle E, Veckerlé C, Brun Y V, van Nieuwenhze M, Bouchier C, Tu K, Rice LB, Arthur M. 2016. Factors essential for L,D-transpeptidase-mediated peptidoglycan cross-linking and β -lactam resistance in *Escherichia coli*. *eLife* 5:e19469.
8. Biarrotte-Sorin S, Hugonnet J-E, Delfosse V, Mainardi J-L, Gutmann L, Arthur M, Mayer C. 2006. Crystal Structure of a Novel β -Lactam-insensitive Peptidoglycan Transpeptidase. *Journal of Molecular Biology* 359:533–538.
9. Mainardi J-L, Hugonnet J-E, Rusconi F, Fourgeaud M, Dubost L, Mouri AN, Delfosse V, Mayer C, Gutmann L, Rice LB, Arthur M. 2007. Unexpected Inhibition of Peptidoglycan

- LD-Transpeptidase from *Enterococcus faecium* by the β -Lactam Imipenem. *Journal of Biological Chemistry* 282:30414–30422.
10. Dubée V, Arthur M, Fief H, Triboulet S, Mainardi J-L, Gutmann L, Sollogoub M, Rice LB, Ethève-Quellejeu M, Hugonnet J-E. 2012. Kinetic Analysis of *Enterococcus faecium* L, D -Transpeptidase Inactivation by Carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 56:3409–3412.
 11. Dubée V, Triboulet S, Mainardi J-L, Ethève-Quellejeu M, Gutmann L, Marie A, Dubost L, Hugonnet J-E, Arthur M. 2012. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* L, D -Transpeptidase Ldt_{Mt1} by Carbapenems and Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 56:4189–4195.
 12. Triboulet S, Dubée V, Lecoq L, Bougault C, Mainardi J-L, Rice LB, Ethève-Quellejeu M, Gutmann L, Marie A, Dubost L, Hugonnet J-E, Simorre J-P, Arthur M. 2013. Kinetic Features of L,D-Transpeptidase Inactivation Critical for β -Lactam Antibacterial Activity. *PLoS ONE* 8:e67831.
 13. Cordillot M, Dubée V, Triboulet S, Dubost L, Marie A, Hugonnet J-E, Arthur M, Mainardi J-L. 2013. *In Vitro* Cross-Linking of *Mycobacterium tuberculosis* Peptidoglycan by L, D -Transpeptidases and Inactivation of These Enzymes by Carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 57:5940–5945.
 14. Peltier J, Courtin P, El Meouche I, Lemée L, Chapot-Chartier M-P, Pons J-L. 2011. *Clostridium difficile* Has an Original Peptidoglycan Structure with a High Level of N-Acetylglucosamine Deacetylation and Mainly 3-3 Cross-links. *Journal of Biological Chemistry* 286:29053–29062.
 15. Sütterlin L, Edoz Z, Hugonnet J-E, Mainardi J-L, Arthur M. 2018. Peptidoglycan Cross-Linking Activity of L, D -Transpeptidases from *Clostridium difficile* and Inactivation of These Enzymes by β -Lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01607-17.
 16. Hernández SB, Dörr T, Waldor MK, Cava F. 2020. Modulation of Peptidoglycan Synthesis by Recycled Cell Wall Tetrapeptides. *Cell Reports* 31:107578.
 17. Tolufashe GF, Sabe VT, Ibeji CU, Ntombela T, Govender T, Maguire GEM, Kruger HG, Lamichhane G, Honarparvar B. 2020. Structure and Function of L,D- and D,D-Transpeptidase Family Enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. *CMC* 27:3250–3267.

18. Aliashkevich A, Cava F. 2022. LD-transpeptidases: the great unknown among the peptidoglycan cross-linkers. *The FEBS Journal* 289:4718–4730.
19. Baranowski C, Welsh MA, Sham L-T, Eskandarian HA, Lim HC, Kieser KJ, Wagner JC, McKinney JD, Fantner GE, Ioerger TR, Walker S, Bernhardt TG, Rubin EJ, Rego EH. 2018. Maturing *Mycobacterium smegmatis* peptidoglycan requires non-canonical crosslinks to maintain shape. *eLife* 7:e37516.
20. García-Heredia A, Pohane AA, Melzer ES, Carr CR, Fiolek TJ, Rundell SR, Lim HC, Wagner JC, Morita YS, Swarts BM, Siegrist MS. 2018. Peptidoglycan precursor synthesis along the sidewall of pole-growing mycobacteria. *eLife* 7:e37243.
21. Lavollay M, Fourgeaud M, Herrmann J-L, Dubost L, Marie A, Gutmann L, Arthur M, Mainardi J-L. 2011. The Peptidoglycan of *Mycobacterium abscessus* Is Predominantly Cross-Linked by L, D-Transpeptidases. *J Bacteriol* 193:778–782.
22. Lavollay M, Arthur M, Fourgeaud M, Dubost L, Marie A, Veziris N, Blanot D, Gutmann L, Mainardi J-L. 2008. The Peptidoglycan of Stationary-Phase *Mycobacterium tuberculosis* Predominantly Contains Cross-Links Generated by L,D-Transpeptidation. *J Bacteriol* 190:4360–4366.
23. Glauner B, Höltje JV, Schwarz U. 1988. The composition of the murein of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 263:10088–10095.
24. Gupta R, Lavollay M, Mainardi J-L, Arthur M, Bishai WR, Lamichhane G. 2010. The *Mycobacterium tuberculosis* protein LdtMt2 is a nonclassical transpeptidase required for virulence and resistance to amoxicillin. *Nat Med* 16:466–469.
25. Pisabarro AG, de Pedro MA, Vázquez 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.
26. Morè N, Martorana AM, Biboy J, Otten C, Winkle M, Serrano CKG, Montón Silva A, Atkinson L, Yau H, Breukink E, den Blaauwen T, Vollmer W, Polissi A. 2019. Peptidoglycan Remodeling Enables *Escherichia coli* To Survive Severe Outer Membrane Assembly Defect. *mBio* 10:e02729-18.

27. Geiger T, Pazos M, Lara-Tejero M, Vollmer W, Galán JE. 2018. Peptidoglycan editing by a specific L_d-transpeptidase controls the muramidase-dependent secretion of typhoid toxin. *Nat Microbiol* 3:1243–1254.
28. Braun V, Wolff H. 1970. The Murein-Lipoprotein Linkage in the Cell Wall of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 14:387–391.
29. Magnet S, Bellais S, Dubost L, Fourgeaud M, Mainardi J-L, Petit-Frère S, Marie A, Mengin-Lecreux D, Arthur M, Gutmann L. 2007. Identification of the L_L, D_L-Transpeptidases Responsible for Attachment of the Braun Lipoprotein to *Escherichia coli* Peptidoglycan. *J Bacteriol* 189:3927–3931.
30. Sanders AN, Pavelka MS. 2013. Phenotypic analysis of *Escherichia coli* mutants lacking L_d-transpeptidases. *Microbiology* 159:1842–1852.
31. Sandoz KM, Moore RA, Beare PA, Patel AV, Smith RE, Bern M, Hwang H, Cooper CJ, Priola SA, Parks JM, Gumbart JC, Mesnage S, Heinzen RA. 2021. β -Barrel proteins tether the outer membrane in many Gram-negative bacteria. *Nat Microbiol* 6:19–26.
32. Bahadur R, Chodiseti PK, Reddy M. 2021. Cleavage of Braun's lipoprotein Lpp from the bacterial peptidoglycan by a paralog of L_L, D_L-transpeptidases, LdtF. *Proc Natl Acad Sci USA* 118:e2101989118.
33. Winkle M, Hernández-Rocamora VM, Püllela K, Goodall ECA, Martorana AM, Gray J, Henderson IR, Polissi A, Vollmer W. 2021. DpaA Detaches Braun's Lipoprotein from Peptidoglycan. *mBio* 12:e00836-21.
34. Cava F, de Pedro MA, Lam H, Davis BM, Waldor MK. 2011. Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids: Distinct pathways for cell wall remodelling. *The EMBO Journal* 30:3442–3453.
35. Dai Y, Pinedo V, Tang AY, Cava F, Geisinger E. 2021. A New Class of Cell Wall-Recycling L_L,D-Carboxypeptidase Determines β -Lactam Susceptibility and Morphogenesis in 12:19.
36. Lam J, Chan R, Lam K, Costerton JW. 1980. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun* 28:546–556.

37. Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. 2014. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev* 78:510–543.
38. Reynolds D, Kollef M. 2021. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs* 81:2117–2131.
39. Anderson EM, Sychantha D, Brewer D, Clarke AJ, Geddes-McAlister J, Khursigara CM. 2020. Peptidoglycomics reveals compositional changes in peptidoglycan between biofilm- and planktonic-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* 295:504–516.
40. Anderson EM, Shaji Saji N, Anderson AC, Brewer D, Clarke AJ, Khursigara CM. 2022. *Pseudomonas aeruginosa* Alters Peptidoglycan Composition under Nutrient Conditions Resembling Cystic Fibrosis Lung Infections. *mSystems* 7:e00156-22.
41. Kumar P, Chauhan V, Silva JRA, Lameira J, d’Andrea FB, Li S-G, Ginell SL, Freundlich JS, Alves CN, Bailey S, Cohen KA, Lamichhane G. 2017. *Mycobacterium abscessus* L, D - Transpeptidases Are Susceptible to Inactivation by Carbapenems and Cephalosporins but Not Penicillins. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00866-17.
42. Voedts H, Kennedy SP, Sezonov G, Arthur M, Hugonnet J-E. 2023. Genome-wide identification of genes required for alternative peptidoglycan cross-linking in *Escherichia coli* revealed an unexpected impact of β -lactams. *Nature Communications*.
43. Sheikh J, Hicks S, Dall’Agnol M, Phillips AD, Nataro JP. 2008. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*: Biofilm formation by EAEC. *Molecular Microbiology* 41:983–997.
44. Lecoq L, Bougault C, Hugonnet J-E, Veckerlé C, Pessey O, Arthur M, Simorre J-P. 2012. Dynamics Induced by β -Lactam Antibiotics in the Active Site of *Bacillus subtilis* L,d-Transpeptidase. *Structure* 20:850–861.
45. 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.

46. Zandi TA, Marshburn RL, Stateler PK, Brammer Basta LA. 2019. Phylogenetic and Biochemical Analyses of Mycobacterial L,D -Transpeptidases Reveal a Distinct Enzyme Class That Is Preferentially Acylated by Meropenem. *ACS Infect Dis* 5:2047–2054.
47. Goffin C, Ghuysen J-M. 1998. Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic Family of Orthologs and Paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1079–1093.
48. Chauhan A, Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. 2012. Full and Broad-Spectrum *In Vivo* Eradication of Catheter-Associated Biofilms Using Gentamicin-EDTA Antibiotic Lock Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 56:6310–6318.
49. Finnegan S, Percival SL. 2015. EDTA: An Antimicrobial and Antibiofilm Agent for Use in Wound Care. *Advances in Wound Care* 4:415–421.
50. Lebeaux D, Leflon-Guibout V, Ghigo J-M, Beloin C. 2015. *In vitro* activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or L -arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70:1704–1712.
51. Ghigo J-M. 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 412:442–445.
52. 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.
53. Voedts H, Dorchène D, Lodge A, Vollmer W, Arthur M, Hugonnet J. 2021. Role of endopeptidases in peptidoglycan synthesis mediated by alternative cross-linking enzymes in *Escherichia coli*. *EMBO J* 40.
54. Atze H, Liang Y, Hugonnet J-E, Gutierrez A, Rusconi F, Arthur M. 2022. Heavy isotope labeling and mass spectrometry reveal unexpected remodeling of bacterial cell wall expansion in response to drugs. *eLife* 11:e72863.
55. Bouhss A, Josseaume N, Severin A, Tabei K, Hugonnet J-E, Shlaes D, Mengin-Lecreux D, van Heijenoort J, Arthur M. 2002. Synthesis of the L -Alanyl- L -alanine Cross-bridge of *Enterococcus faecalis* Peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry* 277:45935–45941.

56. Hmelo LR, Borlee BR, Almlad H, Love ME, Randall TE, Tseng BS, Lin C, Irie Y, Storek KM, Yang JJ, Siehnel RJ, Howell PL, Singh PK, Tolker-Nielsen T, Parsek MR, Schweizer HP, Harrison JJ. 2015. Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. *Nat Protoc* 10:1820–1841.
57. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2022. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method.
58. Rashid MH, Kornberg A. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4885–4890.
59. O'Toole GA. 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *JoVE* 2437.
60. Letunic I, Bork P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research* 49:W293–W296.
61. Houben K, Marion D, Tarbouriech N, Ruigrok RWH, 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* 81:6807–6816.
62. 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.
63. Mathee K. 2018. Forensic investigation into the origin of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 — old but not lost. *Journal of Medical Microbiology* 67:1019–1021.
64. Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, Villanueva J, Wei T, Ausubel FM. 2006. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2833–2838.

Article 2

En préparation

L,D-transpeptidase-mediated adaptation of peptidoglycan structure to growth of *Escherichia coli* in various environments

Ines Hugonneau-Beaufet^{#a}, Stanislas Thiriet-Rupert^{#d}, Magdalena Szczesny^d, Catherine Werts^e, Jean-Philippe Barnier^{a,b,c}, Jean-Emmanuel Hugonnet^a, Jean-Luc Mainardi^{a,b,c}, Antoine Bougouin^a, Ivo Gomperts Boneca^e, Jean-Marc Ghigo^d, Christophe Beloin^{*d}, Michel Arthur^{*a}

^a Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, INSERM, Université Paris Cité, F-75006 Paris France

^b Service de Microbiologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, F-75015 Paris France

^c Université Paris Cité, Faculté de Santé, UFR de Médecine, F-75015 Paris France

^d Institut Pasteur, Université Paris Cité, UMR CNRS 6047, Genetic of Biofilms laboratory, F-75015 Paris France

^e Institut Pasteur, Université Paris Cité, UMR CNRS 6047, INSERM Y1306, Unité de Biologie et Génétique de la Paroi Bactérienne, F-75015 Paris France

Equal contributions

* Corresponding authors

INTRODUCTION

The envelope of Gram-negative bacteria, including that of the model bacterium *Escherichia coli*, is composed of a cytoplasmic membrane (CM), a periplasm containing a thin layer of peptidoglycan (PG) and an outer membrane (OM) (Fig. 1A). The OM and CM act as a selective chemical barrier for nutrients, waste, and toxic compounds. In association with the OM, the PG provides resistance to the turgor pressure of the cytoplasm (Sun *et al.*, 2022). The PG layer is also intimately involved in cell division, determines bacterial cell shape, and serves as a scaffold for the anchoring of various polymers (Dramsi *et al.*, 2008).

PG is a complex net-like macromolecule composed of linear glycan chains cross-linked by short stem peptides. The formation of the PG cross-links is a two-step reaction mostly catalyzed by the D,D-transpeptidase activity of Penicillin-Binding Proteins (PBPs) (Sauvage *et al.*, 2008). In the first step, the catalytic serine of PBPs attacks the amide bond connecting D-Ala⁴ to D-Ala⁵ at the extremity of a donor stem pentapeptide, leading to the formation of an acyl-enzyme and to the release of D-Ala⁵. In the second step, the acyl-enzyme reacts with the third residue of an acceptor stem peptide to form a 4→3 cross-linked dimer with the concomitant release of the PBP (D-Ala⁴→DAP³ cross-link in *E. coli*). Additional non-essential members of the PBP family act as D,D-carboxypeptidases and cleave the D-Ala⁴-D-Ala⁵ peptide bond of pentapeptide stems to form tetrapeptide stems. PG cross-linking can alternatively be catalyzed by L,D-transpeptidases (LDTs) that form 3→3 cross-links connecting the third residues of donor and acceptor PG stem peptides (DAP³→DAP³ in *E. coli*) (Mainardi *et al.*, 2002; Sacco *et al.*, 2010; Hugonnet *et al.*, 2016). These active site Cys enzymes are structurally unrelated to PBPs (Biarrotte-Sorin *et al.*, 2006), use a tetrapeptide formed by D,D-carboxypeptidases as the acyl donor, and form PG cross-links in a two-step reaction analogous to that catalyzed by PBPs (Mainardi *et al.*, 2000, 2005). The D,D-transpeptidase domains of high-molecular weight PBPs are the essential targets of all classes of β -lactam antibiotics. In contrast, LDTs are generally dispensable for growth and are effectively inhibited by β -lactams belonging to the carbapenem class only (Mainardi *et al.*, 2007; Dubée *et al.*, 2012b, 2012a; Triboulet *et al.*, 2013; Cordillot *et al.*, 2013).

In addition to their role in PG cross-linking, members of the LDT family also catalyze the anchoring of proteins to peptidoglycan (Dramsi *et al.*, 2008). In *E. coli*, these specialized LDTs catalyze the formation of an amide bond between the carbonyl of a PG tripeptide donor

stem and the side-chain amine of L-Lys at the C-terminus of the Braun lipoprotein (Lpp) (Magnet *et al.*, 2007). The anchoring of Lpp provides a covalent linkage between the PG and the outer membrane that is thought to stabilize the cell envelope. Peptidoglycan-linked and free forms of Lpp are in dynamic equilibrium since the covalent Lpp→PG linkage is cleaved by hydrolases that are structurally related to LDTs (Bahadur *et al.*, 2021; Winkle *et al.*, 2021). Most bacteria produce multiple members of the LDT family with at least partially redundant functions. For example, *E. coli* produces YcbB and YnhG for PG cross-linking, ErfK, Ybis, and YcfS for anchoring Lpp to the PG, and YafK for hydrolysis of the PG→Lpp amide linkage (Fig. 1A).

The relative contribution of 4→3 and 3→3 cross-links to the reticulation of PG is highly variable between bacterial species. In *E. coli*, as in most bacteria, the PG is mainly cross-linked by PBPs and LDTs have only a minor and unessential contribution to PG synthesis. Pioneering work revealed that the transition from the exponential to the stationary phase of growth is associated with a moderate increase in the contribution of LDTs to PG cross-linking (Pisabarro *et al.*, 1985), but the adaptive value of this modification remains unknown. The D,D-transpeptidase activity of PBPs can be bypassed by LDTs in *in vitro*-selected mutants of *E. coli* and *Enterococcus faecium* leading to high-level resistance to all classes of β-lactams except the carbapenems (Mainardi *et al.*, 2000; Hugonnet *et al.*, 2016). In *E. coli*, this reprogramming of PG synthesis requires overproduction of the YcbB LDT and of the (p)ppGpp alarmone (Hugonnet *et al.*, 2016), better known to trigger the stringent response in conditions of amino acid and phosphatase starvation (Irving *et al.*, 2021). In *E. faecium*, PG reprogramming is mediated by the activation of a cryptic genetic locus encoding a D,D-carboxypeptidase and by loss-of-function of a phospho-protein phosphate resulting in hyper phosphorylation of Ser and Thr residues in a large series of proteins (Sacco *et al.*, 2014, 2015). The 3→3 cross-links are prevalent (70% to 80%) in mycobacteria and *Clostridioides difficile* (Peltier *et al.*, 2011). In *Mycobacterium smegmatis*, LDTs are involved in PG maturation as 4→3 cross-links, mainly present in the neo-synthesized PG, are gradually replaced by 3→3 cross-links in aging PG (Baranowski *et al.*, 2018). In *Mycobacterium tuberculosis*, LDTs are essential for virulence and these enzymes, in combination with PBPs, are the targets of carbapenem therapy currently under evaluation for the treatment of MDR and XDR tuberculosis (Gupta *et al.*, 2010). In other *Actinomycetales*, LDTs were reported to contribute to tolerance to glycopeptide antibiotic in the strains that produce these drugs (Hugonnet *et al.*, 2014).

The envelope of Gram-negative bacteria contains various protein complexes that cross the IM, PG, and OM layers to enable the translocation and assembly of various polymers. Assembly of these export machineries requires limited hydrolysis of the PG to generate holes of sufficient size to accommodate the passage of the protein complexes through the PG network. In *Salmonella enterica* serovar Typhi, an LDT participates in this process by enriching PG in 3→3 cross-links at the cell poles, thereby enabling specific cleavage of these cross-links by a specialized muramidase for translocation of a toxin through the PG layer (Geiger *et al.*, 2018). LDTs may also have physiological roles upon disassembly of the export machineries since holes in the PG network need to be repaired to maintain the osmoprotective barrier of the PG. This role has been unraveled by showing that *E. coli* utilizes the YcbB LDT (LdtD) to avoid cell lysis when the transport of LPS to the OM is compromised (Morè *et al.*, 2019).

Previous studies performed in *E. coli* have shown that LDTs contribute to peptidoglycan maintenance and to the stability of the cell envelope (Sanders and Pavelka, 2013). However, the role of these enzymes to the adaptation of PG metabolism to environmental conditions have not been evaluated. Here, we report a detailed structural analysis of peptidoglycan extracted from bacteria grown in minimal *versus* rich medium and in planktonic *versus* biofilm forms. Using mutants deficient in either or both the formation of 3→3 cross-links and the anchoring of the Braun Lipoprotein, we evaluated the role of LDTs in the formation of biofilms and in the permeability barrier of the IM and OM to a large panel of drugs. Finally, we evaluated whether loss of specific LDTs modifies the release of pro-inflammatory molecules by *E. coli*. Using these approaches, we show that LDTs have multiple roles in the adaptation of *E. coli* to various environments.

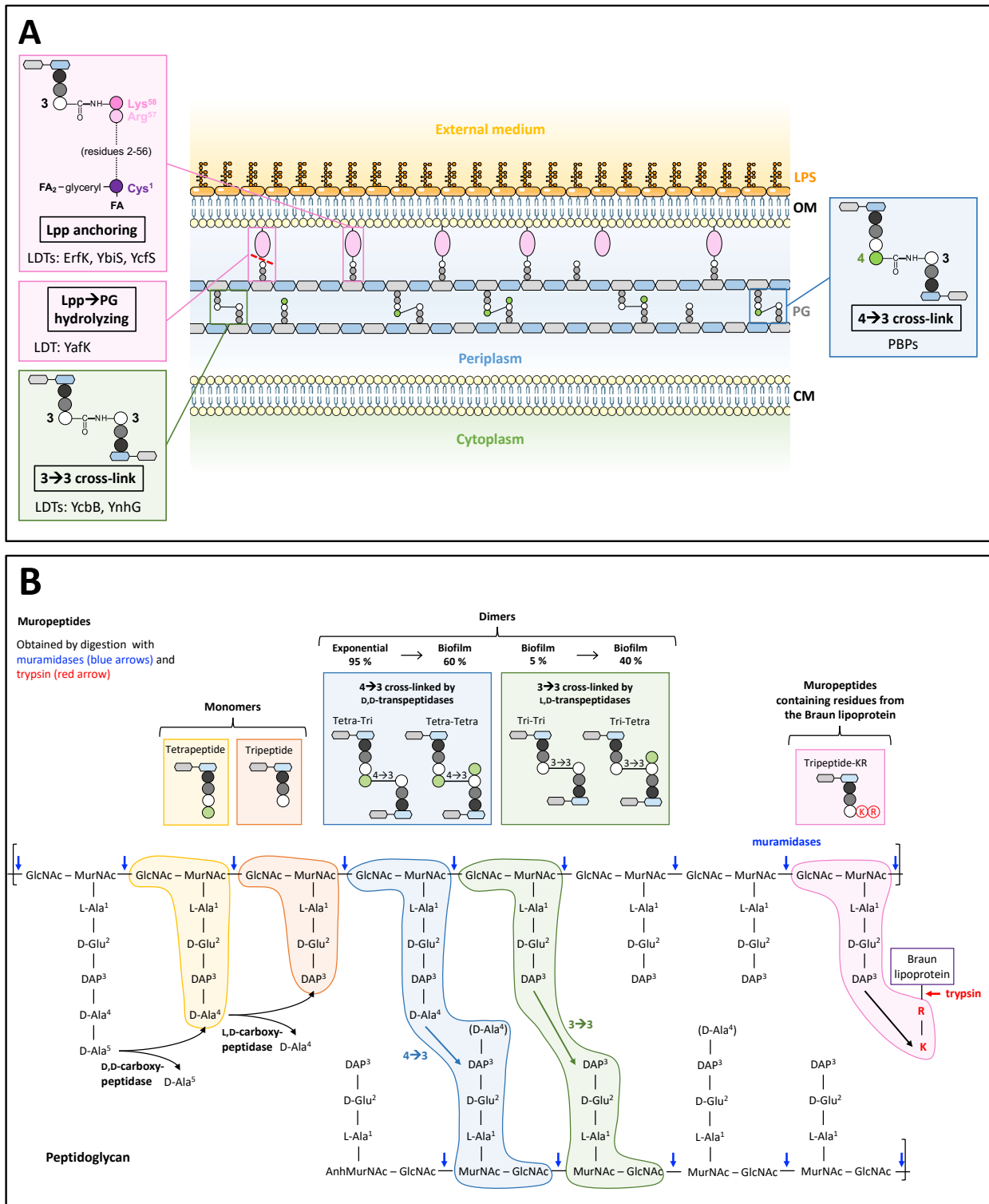


Figure 1. Structure of *Escherichia coli* envelope. (A) The envelope of *E. coli* consists of a thin layer of peptidoglycan (PG) in the periplasmic space between the cytoplasmic and the outer lipid membranes (CM and OM, respectively). The outer membrane is an asymmetric lipid bilayer consisting of phospholipids in the inner leaflet and glycolipids that are mainly lipopolysaccharides (LPS) in the outer

leaflet. The blue insets display the anchoring of the Braun lipoprotein (Lpp) catalyzed by three LDTs called ErfK, YbiS and YcfS, the formation of 3→3 cross-links catalyzed by two LDTs called YcbB and YnhG, and the formation of 4→3 cross-links catalyzed by PBPs. **(B)** Although the PG is assembled from a single subunit, its polymerization and maturation results in structural heterogeneity, which is explored by determining the structure of disaccharide-peptide fragments (muropeptides) obtained by digestion with muramidases. The polymorphisms are generated by (i) the presence of 4→3 and 3→3 cross-links formed by transpeptidases of the D,D and L,D specificities, respectively, (ii) the presence of tetrapeptide and tripeptide stems following cleavage of the D-Ala⁴-D-Ala⁵ and DAP³-D-Ala⁴ amide bonds present in the stem pentapeptide L-Ala¹-D-γGlu²-DAP³-D-Ala⁴-D-Ala⁵ (carboxypeptidases of the D,D and L,D specificities, respectively, and (iii) the anchoring of the Braun lipoprotein by L,D-transpeptidases. The study is based on digestion of peptidoglycan by muramidases (blue arrows) and trypsin (red arrows), and determination of muropeptides that were resolved by *rp*HPLC. R and K (in red) refer to the C-terminal Lys and Arg residues of the Braun lipoprotein that remain attached to the peptidoglycan following digestion of the Braun lipoprotein by trypsin. Abbreviations: DAP, diaminopimelic acid linked to the γ carboxyl of D-Glu (D-γGlu); GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; MurNAc, *N*-acetylmuramic acid.

RESULTS AND DISCUSSION

LDTs have an important contribution to peptidoglycan cross-linking in biofilm. Our first objective was to compare the structure of peptidoglycan of bacteria grown in planktonic form and in biofilm. Peptidoglycan was extracted from three independent cultures of *E. coli* BW25113 grown in biofilm for 96 h in fermenters (see Supplementary Fig. S1 for the study design). Peptidoglycan was also extracted from three independent planktonic cultures of *E. coli* BW25113 grown to the exponential phase of growth ($OD_{600} = 0.5$). Peptidoglycan was digested with proteases (proteinase K and trypsin) and muramidases (lysozyme and mutanolysin). The resulting muropeptides (disaccharide-peptides) were reduced and separated by *rp*HPLC (Fig. 2A). Muropeptides were identified by their retention time and by mass spectrometry. The presence of 3→3 or 4→3 cross-links in dimers was determined by digestion with the endopeptidase R39, which is specific for 4→3 cross-links (Lavollay *et al.*, 2009). Quantification was based on integration of the peak areas in *rp*HPLC chromatograms (absorbance at 205 nm) with two technical replicates for each biological sample.

Growth in biofilm was not associated with production of any muropeptide with an original structure that was not present in the peptidoglycan preparations from planktonic cells (see Fig. 1B for the origin of polymorphisms in peptidoglycan fragments). In contrast, there were large variations in the relative abundance of specific muropeptides. Regarding disaccharide-peptide monomers, we based our quantitative analyses on three muropeptides

(1, 2 and 3 in Fig. 2B) containing a linear tripeptide (L-Ala-D-γGlu-DAP) or tetrapeptide (L-Ala-D-γGlu-DAP-D-Ala) stem or a tripeptide stem with a lysyl and an arginyl (KR) residue originating from the Braun Lipoprotein, respectively. Among monomers, the proportion of mucopeptides with a linear tripeptide was increased to the detriment of mucopeptides with a linear tetrapeptide in biofilm conditions (Fig. 2B). This difference may be related to an increased activity of L,D-transpeptidases since these enzymes hydrolyze the DAP³-D-Ala⁴ peptide bond of tetrapeptide stems to form tripeptide stems (L,D-carboxypeptidase activity) in addition to the formation of 3→3 cross-links (Mainardi *et al.*, 2005; Magnet *et al.*, 2008). Mucopeptides containing the KR fragment of the Braun lipoprotein were present in similar amounts (Fig. 2B).

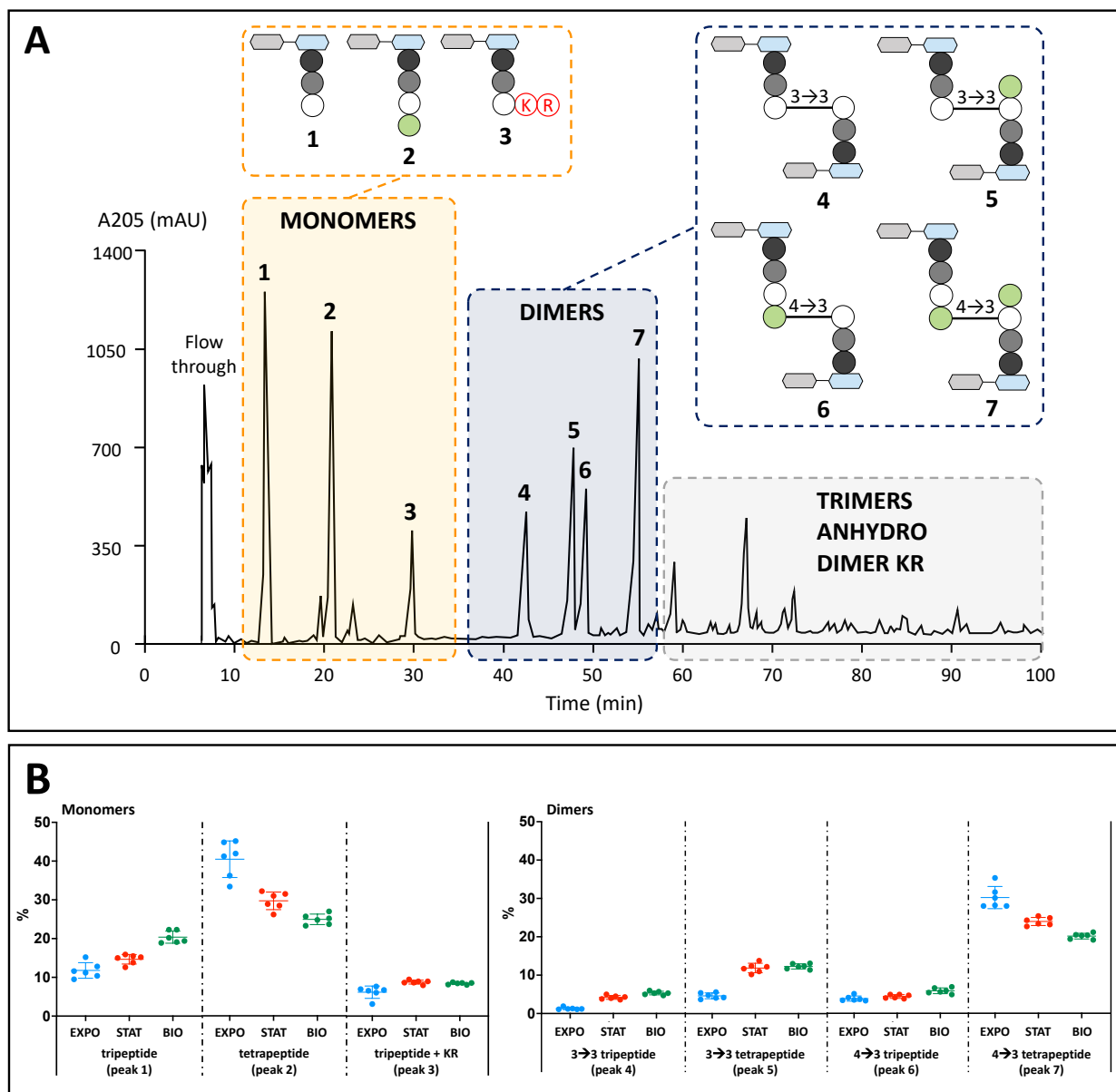
Regarding disaccharide-peptide dimers, we based our quantitative analyses on four mucopeptides (4, 5, 6, and 7 in Fig. 2B) differing by the presence of 3→3 or 4→3 cross-links formed by transpeptidases of the L,D or D,D specificity, respectively, and additionally by the presence or absence of D-Ala at the fourth position of the acceptor stem. Such tripeptide stems may originate from the L,D-carboxypeptidase activity of the L,D-transpeptidases as described above for monomers. The abundance of both types of 3→3 cross-linked dimers was significantly increased in bacteria growing in biofilm ($P < 0.05$).

Fig. 2C provides a highlight on the characteristics of peptidoglycan from bacteria grown in biofilm by combining the abundance of mucopeptides with common structural features. The contribution of L,D-transpeptidases to peptidoglycan polymerization in biofilm was important as more than 40% of the cross-links were of the 3→3 type (*versus* 14.5% for exponential growth in planktonic form, $P < 0.05$). Growth in biofilm also led to an increase in the proportion of mucopeptides containing a stem tripeptide (from 18.4% for exponential growth in planktonic form to 35.5% in biofilm; $P < 0.05$). These modifications are landmarks of the transpeptidase and carboxypeptidase activities of LDTs.

The proportion of monomers among all mucopeptides remained similar indicating that the overall extent of peptidoglycan cross-linking was not affected (Fig. 2C). Thus, the increased contribution of L,D-transpeptidases to peptidoglycan polymerization mainly occurred at the detriment of that of D,D-transpeptidases. Anchoring of the Braun lipoprotein was not grossly affected by growth in biofilm (Fig. 2C).

As expected, the 3→3 crosslink content was increased for planktonic cultures grown to the stationary phase (14.5% in exponential phase *versus* 36.3% in stationary phase) (Fig. 2C). Overall, the structure of PG extracted from stationary cultures of planktonic bacteria was

similar to that of PG extracted from bacteria grown in biofilm with the exception of a higher abundance of tripeptide stems for the biofilm conditions. These results indicate that the contribution of the carboxypeptidase activity of LDTs is important in biofilm.



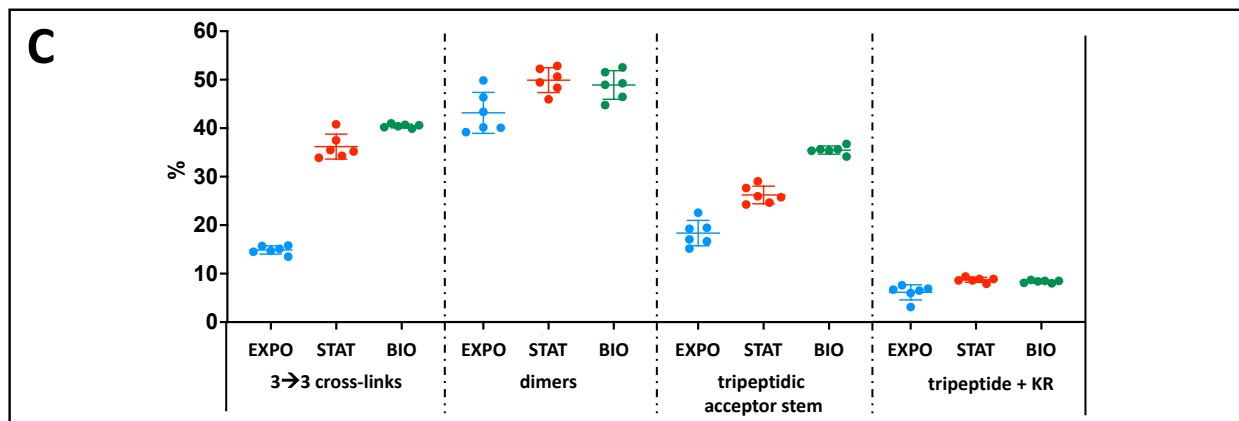


Figure 2. Peptidoglycan analysis of *E. coli* BW25113 grown in planktonic and in biofilm in minimal medium. (A) *rp*HPLC profile of the peptidoglycan of *E. coli* grown in biofilm in M63B1 minimal medium. The structure of the monomers is presented in the yellow square and the structure of the dimers is displayed in the blue square, with the numbers corresponding to the associated peaks in the profile. Grey hexagon, GlcNAc; blue hexagon, MurNAc; black disk, L-Ala; grey disk, D-iGlu; white disk, DAP; green disk, D-Ala; K and R circled in black, amino acid residues corresponding to the Arg-Lys C-terminal extremity of the Braun lipoprotein. (B) Relative abundance of monomers and dimers in the peptidoglycan of *E. coli* grown in exponential phase (EXPO, blue dots), stationary phase (STAT, red dots) and biofilm (BIO, green dots). Data originate from three biological repeats and two technical repeats for each of these biological repeats. (C) Characteristics of peptidoglycan isolated from bacteria grown in biofilm or in planktonic form. Proportion of dimers with 3→3 cross-links among all dimers, proportion of monomers among all muropeptides, proportion of muropeptides with a tripeptide acceptor stem among all muropeptides and proportion of muropeptides containing residues of the Braun lipoprotein among all muropeptides. The horizontal line indicates the mean % value and the vertical line indicates the standard deviation. EXPO, exponentially growing *E. coli* (OD₆₀₀ = 0.5); STAT, *E. coli* grown for 24h to the stationary phase; BIO, BW25113 grown for 96 h in biofilm in microfermentors.

The contribution of LDTs to PG metabolism is higher in minimal than in rich medium. Our second objective was to assess the impact of the growth medium on the muropeptide composition. Toward this aim, the analysis reported in Fig. 2 (above) was repeated by switching the growth medium from the M63B1 minimal medium to lysogeny broth (LB). This analysis reveals the same trends in comparing the three growth conditions (*i.e.* biofilm, planktonic exponential, and planktonic stationary) (Supplementary Fig. S2). However, the differences between the three growth conditions were less pronounced as exemplified by the 3→3 cross-link content in Fig. 3. Overall, the relative proportion of 3→3 cross-links significantly higher in minimal medium compared to rich medium (14.9% versus 7.6% in

exponential phase, 36.3% versus 16.4% in stationary phase, 40.5% versus 13.8% in biofilm, $P < 0.05$ for each comparison).

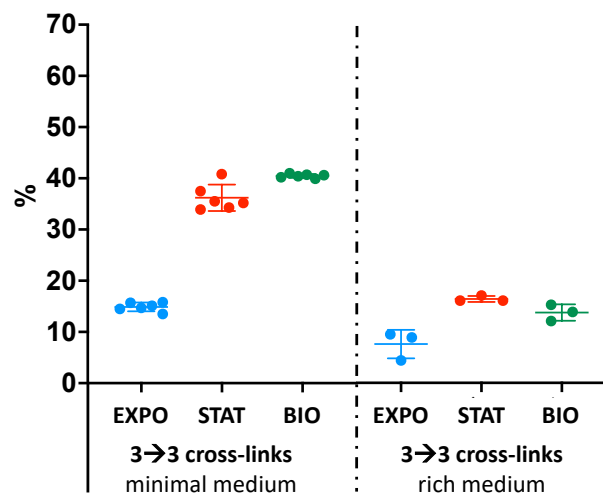


Figure 3. Relative abundance of 3→3 cross-linked dimers in the peptidoglycan of *E. coli* grown in minimal versus rich medium. Proportion of dimers with 3→3 cross-links among all dimers extracted from the peptidoglycan of *E. coli* grown in exponential phase (EXPO, blue dots), stationary phase (STAT, red dots) and biofilm (BIO, green dots), either in minimal medium (M63B1) or in rich medium (LB). The horizontal line indicates the mean % value and the vertical line indicates the standard deviation. EXPO, exponentially growing *E. coli* ($OD_{600} = 0.5$); STAT, *E. coli* grown for 24h to the stationary phase; BIO, BW25113 grown for 96 h in biofilm in microfermentors.

Both YcbB and YnhG contribute to PG cross-linking in in biofilm. Previous analyses have established that the genome of *E. coli* encodes two LDTs (YcbB and YnhG) that form 3→3 cross-links (Magnet *et al.*, 2008; Hugonnet *et al.*, 2016). Our new objective was to evaluate the relative contribution of these two enzymes to peptidoglycan cross-linking in bacteria grown in biofilm. As expected from previous analyses, formation of 3→3 cross-links was fully abolished only for deletion of both the *ycbB* and *ynhG* genes (Fig. 4A). Deletion of *ynhG* alone had a minor impact on the proportion of 3→3 cross-links among dimers, whereas this proportion was reduced by *ca.* 50% in the $\Delta ycbB$ mutant. This observation may be accounted for by two types of mutually non-exclusive explanations. The contribution of YnhG might be marginal in the parental strain producing both L,D-transpeptidases although YnhG is able to partially compensate for the loss of YcbB in the $\Delta ycbB$ mutant. Alternatively, the contribution of the two enzymes might be similar in the parental strain although compensation by the remaining L,D-transpeptidase in single-deletion mutants was only observed for YcbB. We concluded that

YcbB and YnhG have at least partially redundant functions. However, the low impact of the *ynhG* deletion favors the hypothesis that YcbB might be the major L,D-transpeptidase active in biofilms. This conclusion is also supported by the analysis of the proportion of monomers among all muropeptides (Fig. 4A), which was used to evaluate the impact of deletion of L,D-transpeptidase genes on the overall peptidoglycan crosslinking. Indeed, deletion of *ycbB* but not *ynhG* increased the proportion of monomers. It is also worth noting that YcbB, but not YnhG, was previously found to fully bypass the D,D-transpeptidase activity of PBPs in derivatives of *E. coli* BW25113 that overproduced the alarmone (p)ppGpp (Hugonnet *et al.*, 2016).

Deletion of either *ynhG* or *ycbB* had little impact on the relative abundance of muropeptides containing residues from the Braun lipoprotein, whereas an increase in the relative abundance of these muropeptides was observed in the double mutant (Fig. 4A). These results are in agreement with previous analyses that showed that anchoring of the Braun lipoprotein is mediated by other L,D-transpeptidases (ErfK, YcfS, and YbiS) (Magnet *et al.*, 2007). Increased attachment of the Braun lipoprotein to the peptidoglycan of the double Δ *ynhG* Δ *ycbB* mutant may be accounted for by several explanations, including the possibility that LDTs compete between each other for limited amounts of tetrapeptide-containing donor substrate (Supplementary Fig. S3). According to this hypothesis, larger amounts of tetrapeptide would be available to ErfK, YcfS, and YbiS in the absence of YnhG and YcbB. Deletion of *ynhG* and *ycbB* reduced but did not eliminate muropeptides containing a tripeptide stem. This observation is in agreement with previous analyses that showed that ErfK, YcfS, and YbiS also contribute to formation of tripeptide stems (Magnet *et al.*, 2008).

The genes encoding YcbB and YnhG are both expressed at a higher level in biofilm than in the planktonic growth condition. To further evaluate the contribution of YcbB and YnhG to PG cross-linking in biofilm, a *lacZ* reporter gene was introduced downstream from *ynhG* and *ycbB* into the chromosome of *E. coli* BW25113 to monitor the level of transcription of the L,D-transpeptidase genes (Fig. 4B). Comparison with planktonic growth indicated that both genes are highly expressed in biofilm conditions. Thus, the increase in the proportion of 3→3 cross-links detected in biofilm appears to at least partially result from increased production of both L,D-transpeptidases. This additional experiment further suggests that both L,D-

transpeptidases contribute to peptidoglycan cross-linking despite the minor impact of the *ynhG* deletion (above, Fig. 4A).

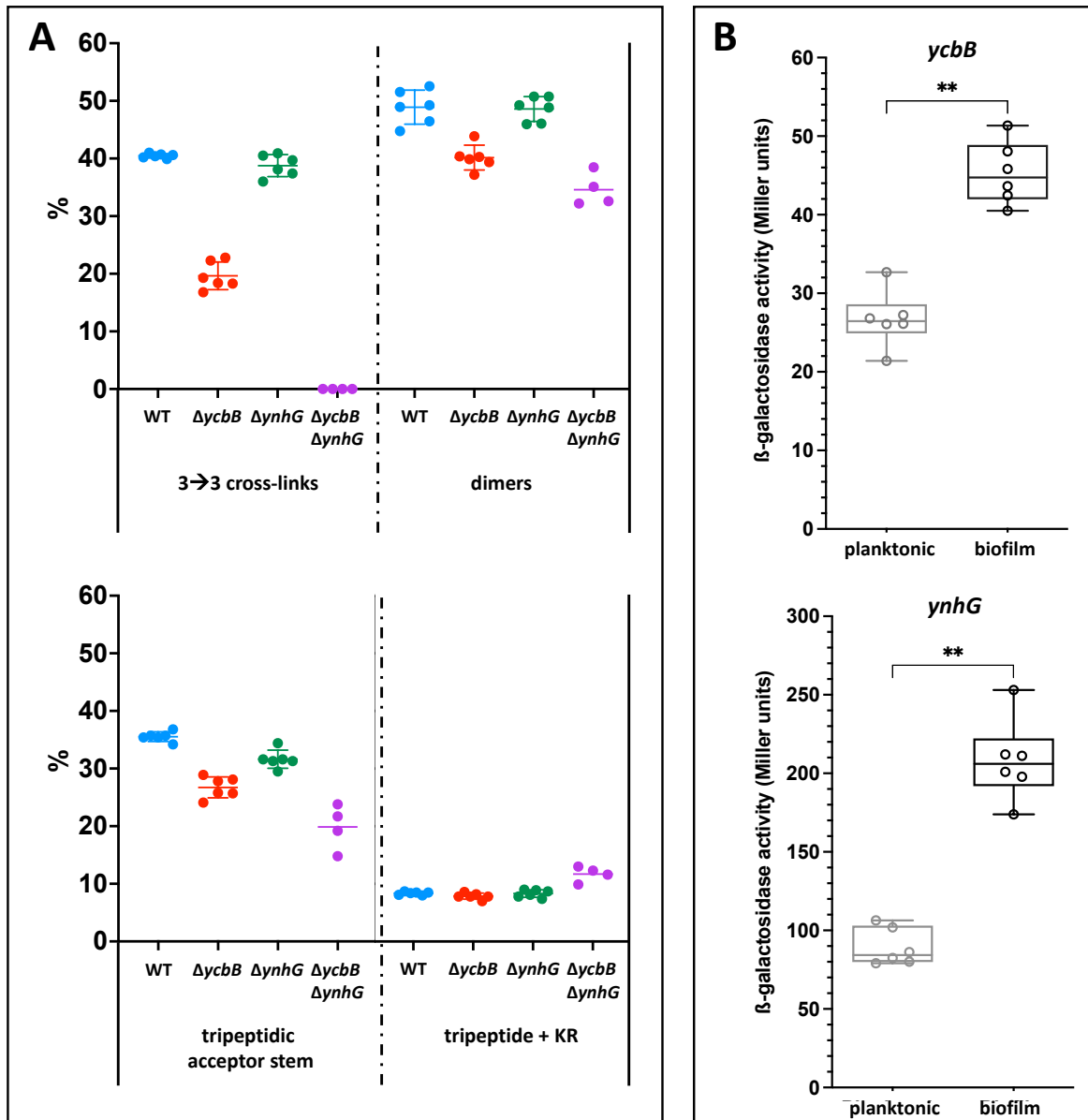


Figure 4. YcbB and YnhG activity in biofilm. (A) Impact of *ynhG* and *ycbB* deletions on peptidoglycan structure in biofilms. *E. coli* BW25113 and derivatives obtained by deletion of the *ynhG* and *ycbB* L,D-transpeptidase genes, alone or in combination, were grown in biofilm for 96 h in minimal medium. Abbreviations: 3→3 cross-links, proportion of dimers with 3→3 cross-links among dimers; dimers, proportion of dimers among all muropeptides; tripeptidic acceptor stem, proportion of muropeptides with a tripeptide stem among all muropeptides; tripeptide + KR, proportion of muropeptides containing residues of the Braun lipoprotein among all muropeptides. (B) β -galactosidase activity in derivatives of *E. coli* BW25113 harboring chromosomal *ycbB-lacZ* and *ynhG-lacZ* transcriptional

fusions. Planktonic, exponential phase of growth ($OD_{600} = 0.5$); Biofilm, growth for 96 h in biofilm. **** $P < 0.01$** ; Two-tailed Mann-Whitney nonparametric test.

Deletion of all six *ldt* genes incurs marginal effects on bacteriostatic activity of a 16 antibiotics panel. The bacteriostatic activity of drugs was tested by the disk diffusion assay on Muller-Hinton (MH) agar and on MH supplemented with amoxicillin or ceftriaxone to detect any drug-drug interaction. MH supplemented with lysozyme, biliary salt, SDS and EDTA was additionally used to determine whether these compounds impair the permeability barrier of the cell envelop and potentiate drug activity. Data presented in Supplementary Tables S1 and S2 indicate that deletion of the six *ldt* genes had marginal effects on the diameter of inhibition zones. A difference of at least 5 mm in the diameters of inhibition zones was taken as a significance threshold. Accordingly, the $\Delta 6$ deletion increased susceptibility to only one of the 16 tested drugs (fosfomycin with a 5 mm difference). Comparison of antibiograms performed on SDS and lysozyme supplemented media indicated that these compounds tend to antagonize the activity of non β -lactam antibiotics. The diameter of the inhibition zones was not affected by supplementation of the growth medium with amoxicillin, ceftriaxone, or biliary salts, except for an 8 mm increase in the inhibition zone for colistin in the presence of biliary salts. Supplementation with EDTA marginally increased susceptibility of the $\Delta 6$ strain to the amoxicillin/clavulanic acid combination (a 6 mm difference), to ceftiofime (8 mm), erythromycin (6 mm), and to the sulfamethoxazole/trimethoprim (5 mm) combination. Together these results indicate that loss of all LDTs does not drastically compromise the permeability barrier of the outer membrane.

Loss of the Braun lipoprotein or of its anchoring to PG results in the release of the periplasmic content. Western blot analysis indicated that the deletion of *ldt* genes or of *lpp* did not result in bacterial cell lysis since the cytoplasmic α subunit of the RNAP was not detected in the culture supernatants (Fig. 5A). In contrast, the periplasmic maltose binding protein (MBP) was released in the culture supernatants of derivatives of BW25113 lacking *Lpp* (Δlpp) or deficient in the anchoring of this lipoprotein ($\Delta 3$ and $\Delta 6$). MBP was not detected in the supernatants of the wild-type parental strain and in the derivative lacking *ycbB* and *ynhG* ($\Delta 2$). These results show that the anchoring of the lipoprotein to the peptidoglycan is essential to prevent the leakage of the periplasmic content into the culture medium.

Loss of the Braun lipoprotein or of its anchoring to peptidoglycan compromise survival *E. coli* in the presence of EDTA. Incubation of the Δlpp , $\Delta 3$, and $\Delta 6$ mutants in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 500 μ M EDTA resulted in a rapid and extensive bacterial killing, which was not observed with the parental strain and the $\Delta 2$ mutant (Fig. 5B). These results indicate that the covalent link between the PG layer and the outer membrane provided by the Braun lipoprotein is essential to prevent destabilization of the envelope in the presence of EDTA. The experiment was repeated by adding EDTA directly to the stationary phase cultures performed in LB broth or in minimal medium. Under such conditions, the extent of bacterial killing by EDTA was less pronounced and highly variable between experiments. This may account for the fact that EDTA had moderate impact on the bacteriostatic activity of drugs (Supplementary Tables S1 and S2).

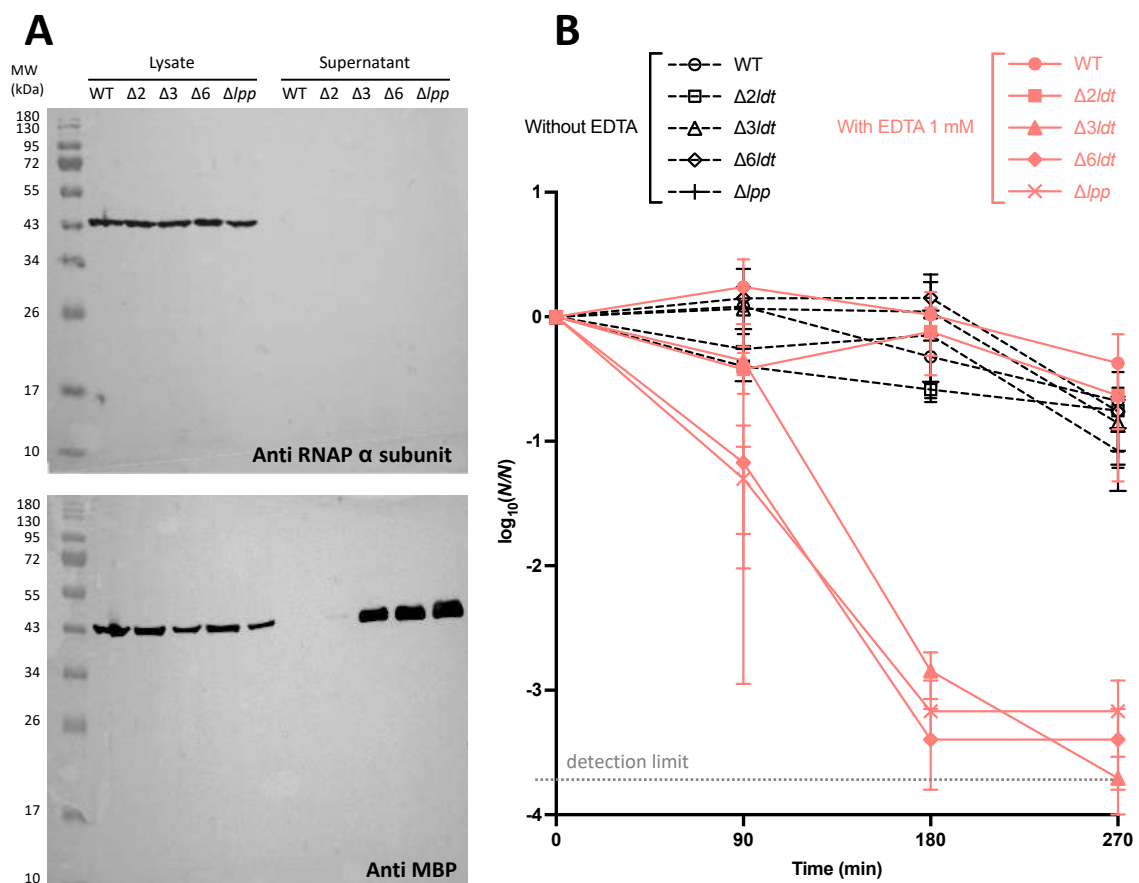


Figure 5. Phenotypes associated with the absence of Lpp or of its anchoring to the peptidoglycan. (A) Immunodetection of the α subunit of the RNAP and of the maltose-binding protein (MBP) in lysates and culture supernatants. (B) Killing of *E. coli* by EDTA. Overnight cultures of *E. coli* BW25113 WT and

mutants were resuspended in Tris-HCl pH 8.0 and incubated with 1 mM EDTA (closed pink symbols and solid lines) or without EDTA (open black symbols and dotted lines). Bacteria were enumerated at 0, 90, 180, and 270 min. The dotted red line indicates the detection limit, *i.e.* the minimal number of CFUs that can be counted with this technique. Data are the mean \pm standard error of the mean from three independent biological repeats.

Deletion of *ldt* genes does not alter the release of NOD1 and NOD2 agonists by *E. coli*. NOD1 and NOD2 are sensors of peptidoglycan fragments generated by a controlled hydrolysis of sacculi that is essential to enable insertion of new subunits in the expending cell wall (Chamaillard *et al.*, 2003; Girardin, 2003; Girardin *et al.*, 2003a, 2003b). NOD1 recognizes a dipeptide composed of D-Glu and DAP residues (iE-DAP) whereas NOD2 recognizes a muramyl dipeptide (MDP), consisting in the L-Ala-D-Glu dipeptide linked to a MurNAc residue. Since replacement of 4 \rightarrow 3 by 3 \rightarrow 3 peptidoglycan cross-links does not involve the assembly of peptide stems with an unusual amino acid composition, the same NOD1 and NOD2 agonists are potentially generated by controlled hydrolysis of the two PG chemotypes. However, the 4 \rightarrow 3 and 3 \rightarrow 3 cross-links are cleaved by distinct sets of endopeptidases (Chodiseti and Reddy, 2019; Voedts *et al.*, 2021). We therefore considered that an enrichment in 3 \rightarrow 3 cross-links could indirectly affect the amount of NOD1 and NOD2 agonists released in the culture medium due to differences in the pathways underlying controlled hydrolysis of 4 \rightarrow 3 and 3 \rightarrow 3 cross-linked peptidoglycans. To address this question, the extend of the NOD1 and NOD2 responses were evaluated by testing culture supernatants of the parental strain BW25113 and in its $\Delta 2$ and $\Delta 3$ derivatives grown in biofilm or in planktonic conditions to both the exponential and stationary phases of growth (Fig. 6). This analysis showed that the release of NOD1 and NOD2 agonists was affected neither by the growth conditions nor by deletion of *ldt* genes mediating the formation of 3 \rightarrow 3 PG cross-links or the anchoring of the Braun lipoprotein.

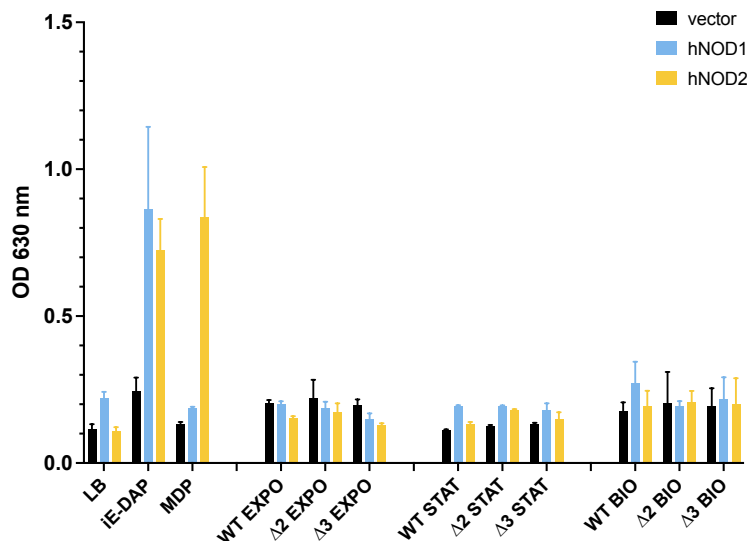


Figure 6. Impact of *ldt* genes inactivation on the release of NOD1 and NOD2 agonists in planktonic growth and in biofilm. NF- κ B reporter assays were performed in HEK-Blue cells transfected with plasmids encoding human NOD1 (blue bars) or NOD2 (yellow bars), or with the vector (black bars). Stimulation of the NODs was tested with culture supernatants from *E. coli* BW25113 WT, $\Delta 2$, and $\Delta 3$ obtained from exponential (EXPO) or stationary phase (STAT) planktonic cultures or from biofilms (BIO). LB was used as a negative control; iE-DAP and MDP were used as positive controls.

CONCLUSION

Previous analyses showed that the formation of 3 \rightarrow 3 cross-links by LDTs is fully dispensable for growth of *Escherichia coli* in laboratory conditions (Aliashkevich and Cava, 2022). By-pass of PBPs by LDTs results in high-level β -lactam resistance but this mechanism is restricted to mutants selected *in vitro* and incurs severe growth defects indicating that its emergence in clinical isolates is highly unlikely (Hugonnet *et al.*, 2016). YcbB (LdtD) is conditionally essential in mutants depleted for the essential LptC protein involved in the export of LPS (Morè *et al.*, 2019). Neither of these analyses directly provides a clue for the physiological role of the LDTs. Indeed, the enrichment in 3 \rightarrow 3 cross-links in the stationary phase of growth and the control of *ynhG* by the stationary-phase sigma factor σ^S suggest that YnhG might be involved in the adaptation of the peptidoglycan metabolism to the transition from the exponential to the stationary phase of growth (Battesti *et al.*, 2011). However, this possibility has not been experimentally evaluated. Likewise, *ycbB* regulation by CpxR and the role of YcbB in LptC-depleted cells only indirectly show that this LDT might have a critical role in stress responses (Delhaye *et al.*, 2016). In contrast, we show here that growth in biofilm resulted in a

substantial increase (from 14% to 40%) in the proportion of cross-links formed by the LDTs and in increased transcription of *ynhG* and *ycbB*. These results suggest that a high peptidoglycan content in 3→3 cross-link is an adaptation of the peptidoglycan metabolism to conditions that prevail in biofilms. These results also suggest that YnhG and YcbB are actionable targets to treat bacteria in biofilm or to prevent biofilm formation. Of note, LDTs are inactivated by carbapenems and by β -lactamase inhibitors belonging to the diazabicylooctane family such as avibactam indicating that these drugs could be considered in the development of effective therapies to eradicate biofilms (Edoo *et al.*, 2018).

Our results also show that loss-of-function of LDTs did not affect the release of peptidoglycan fragments acting as agonist of NOD1 and NOD2. This possibility was initially considered as formation of 3→3 cross-links could potentially alter peptidoglycan turnover (Wolf and Underhill, 2018).

The deletion of genes encoding the Braun lipoprotein (*lpp*) or of the three genes (*ybiS*, *ycfS*, and *erfK*) encoding LDTs responsible for its anchoring to the peptidoglycan resulted in phenotypes that were clearly distinct from those caused by deletion of the *ynhG* and *ycbB* genes. These phenotypes included high susceptibility to the bactericidal activity of EDTA and the release of the periplasmic content in the culture supernatant. The former phenotype indicates that the stability of the outer membrane is compromised by the conjugated effects of (i) a defect in the formation of the Lpp-mediated covalent link connecting the outer membrane to the peptidoglycan, and (ii) of a defect in the stabilization of the outer leaflet of the outer membrane by divalent cations that are known to be essential for neutralizing the negative charges of LPSs (Clifton *et al.*, 2015). The latter phenotype showed that part of the periplasmic content is released in the culture supernatant in the absence of the peptidoglycan-outer membrane link, a release that does not involve cell lysis in the absence of EDTA. This conclusion is supported by the fact that the alpha subunit of RNA polymerase, used as a cytoplasmic marker, was not detected by Western blot analyses of the supernatant, in contrast to the periplasmic maltose-binding protein. Loss of Lpp or of its anchoring to peptidoglycan did not result in a loss of the permeability barrier provided by the outer membrane since loss of Lpp or of its anchoring did not result in any increase in the susceptibility to a large panel of drugs, including drugs that act in the periplasm and are excluded by the outer membrane such as vancomycin. Budding of the outer membrane in the absence of the peptidoglycan-Lpp link provides a likely mechanism for increased formation of

outer membrane vesicles (OMVs), as previously proposed (Avila-Calderón *et al.*, 2021). Since OMV release has been linked to many physiological processes, such as toxin delivery, intercellular communication, alternative protein release mechanisms, and modulation of the host immune response (Avila-Calderón *et al.*, 2015), increasing their biogenesis under carbapenem inhibition of both types of LDTs may have an unexpected impact on pathogenicity.

METHODS

Construction of *E. coli* mutants carrying gene deletions. The Keio collection is composed of 3,985 mutants of *E. coli* K-12 strain BW25113. This set of single-gene deletions has been 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 and Wanner, 2000). For multiple gene deletions, the Km^R cassette was removed by the FLT recombinase encoded by plasmid pCP20. PCR amplifications were performed to confirm the presence of the expected deletions at each deletion step. Every construction has been made in the same background, namely that of the wild-type *E. coli* BW25113 from our laboratory collection.

Cultures of *E. coli* BW25113 in planktonic and biofilm conditions. *E. coli* BW25113 and mutants were grown either in M63B1 medium [KH_2PO_4 100 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 15 mM, $MgSO_4$ 0.8 mM, vitamin B1 3 μ M, pH 7.4] containing glucose (0.4%) or in Lysogeny (Miller) broth (LB). Continuous-flow microfermentors containing a removable glass spatula were used for biofilm development (Chalabaev *et al.*, 2014). The glass spatulas were inoculated for 2 min by dipping in an overnight culture adjusted to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 1.0. Bacteria were recovered from fermenters incubated for 96 h at 37°C. Planktonic *E. coli* BW25113 was grown to an OD_{600} of 0.5 (exponential phase of growth) or during 24h to a stationary phase of growth either in M63B1 medium containing glucose (0.4%) or in LB. Incubation was performed at 37°C with vigorous shaking. For each condition, three biological replicates were performed starting the inoculation of three independent precultures with isolated colonies.

Peptidoglycan extraction for quantitative analysis. The hot SDS procedure was used to extract the PG sacculi, which were then treated with pronase and trypsin (Magnet et al., 2008; Hugonnet et al., 2016). Muropeptides were solubilized by digestion with muramidases, reduced with NaBH₄, and purified by *rp*HPLC (3 μm, 250 x 4.6 mm, Hypersil-Keystone for minimal medium, and Hypersil Gold aQ for rich medium, Thermo Fisher). The mass of muropeptides was determined on a Bruker Daltonics maXis high resolution mass spectrometer (Bremen Germany) operating in the positive mode, as previously described (Voedts et al., 2021; Atze et al., 2022).

Antimicrobial susceptibility testing. Antibiograms were performed by the disk diffusion assay in cation-adjusted Muller Hinton (MH) agar plates according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2022). The plates were supplemented with 0.25 μg/ml amoxicillin, 0.01 μg/ml ceftriaxone, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 mg/ml lysozyme, 2 mg/ml bile salts or 0.25 mg/ml ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

Western blot analysis. The maltose binding protein (MBP) and the α subunit of the RNA polymerase (RNAP) were detected by immunoblotting using specific mouse monoclonal antibodies (Sigma-Aldrich and Neoclone, respectively). Proteins in culture supernatants and cell lysates were separated by SDS-PAGE, electrotransferred to a polyvinylidene difluoride membrane, and probed with the antibodies. Chemiluminescence detection was performed with anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich). Imaging was performed on an iBright imaging system (ThermoFisher).

To prepare protein samples, bacteria were grown overnight in M9 minimal medium supplemented with 0.2 % maltose. Bacteria were collected by centrifugation, resuspended in PBS buffer, and lysed by sonication (lysates). The culture supernatants were filtered (0.45 μm). Proteins were precipitated with trichloroacetic acid (20% final concentration), collected by centrifugation, and washed twice with acetone.

Bactericidal activity of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Bacteria were grown overnight to the stationary phase in LB (Miller) broth at 37 °C and washed twice in a 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). Bacteria were resuspended in the same buffer to a final OD₆₀₀ of 0.9

and EDTA was added at a final concentration of 1 mM. Bacteria were incubated at 37 °C, and viable cell counts were performed at the beginning of the incubation and at 90 min, 180 min, 270 min. To do so, 10-fold dilutions (10^{-1} to 10^{-7}) were prepared in LB broth and 5 μ l of the resulting bacterial suspensions were spotted on LB agar plates.

Detection of NOD1 and NOD2 activation by the NF- κ B assay in human epithelial cell lines.

HEK-Blue-hNOD1 and HEK-Blue-hNOD2 cells were obtained by co-transfection of the human NOD1 or NOD2 genes and an inducible SEAP reporter gene into HEK293 cells. In both cases, the SEAP gene is placed under the control of the IFN- β minimal promoter fused to five NF- κ B and AP-1-binding sites. Depending on the cell, stimulation with a NOD1 or NOD2 ligand activates NF- κ B and AP-1 resulting in induction of SEAP production, which is detected with a chromogenic substrate directly in the culture medium. For transfection, cells were detached, seeded in cell culture dishes at less than 30% confluence and incubated overnight at 37 °C, 5% CO₂. The following day, cell transfections were performed whilst the cells remained under 60% confluence with a total amount of 3 μ g of DNA per dish. Between 100 ng to 1 μ g of plasmid carrying the NOD1 or NOD2 gene or the corresponding empty vector (was added in each dish. On day 3, transfected cells were stimulated in 96-wells plates with supernatants of bacterial cultures.

Tested samples were supernatants of cultures performed in LB broth corresponding to growth in biofilm for 96 h and in planktonic form to the stationary phase (24 h) or to the exponential phase (OD₆₀₀ of 0.5). The growth conditions were the same as those used for peptidoglycan analysis.

Statistical Analyses. The data were analyzed using GraphPad Prism version 9 (La Jolla, CA, USA). An unpaired t-test was performed to analyze the relative abundance of mucopeptides in the peptidoglycan of *E. coli* BW25113 and mutants. ns, $P > 0.05$; *, $0.1 < P \leq 0.05$; **, $0.001 < P \leq 0.01$; ***, $0.0001 \leq P \leq 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

ACKNOWLEDGEMENTS

High-resolution mass spectra were obtained at the Plateforme de Spectrométrie de Masse Bio-organique of the Muséum d'Histoire Naturel. This work was supported by the Agence National pour la Recherche, Projet ANR-19-CE15-0006-01 "PeptidoAdapt", Programme AAPG

2019 to MA and JM G. This work was also supported by the French government's Investissement d'Avenir Program, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant n°ANR-10-LABX-62-IBEID). S.T.-R was supported by the French National Research Agency (ANR), project EvoITolAB (ANR-18-CE13-0010). We thank A Filloux for the generous gift of *P. aeruginosa* mutants obtained by transposon insertion (full library available at <http://ausubellab.mgh.harvard.edu/cgi-bin/pa14/home.cgi>).

REFERENCES

- Aliashkevich, A., Cava, F., 2022. LD-transpeptidases: the great unknown among the peptidoglycan cross-linkers. *The FEBS Journal* 289, 4718–4730. <https://doi.org/10.1111/febs.16066>
- Atze, H., Liang, Y., Hugonnet, J.-E., Gutierrez, A., Rusconi, F., Arthur, M., 2022. Heavy isotope labeling and mass spectrometry reveal unexpected remodeling of bacterial cell wall expansion in response to drugs. *eLife* 11, e72863. <https://doi.org/10.7554/eLife.72863>
- Avila-Calderón, E.D., Araiza-Villanueva, M.G., Cancino-Diaz, J.C., López-Villegas, E.O., Sriranganathan, N., Boyle, S.M., Contreras-Rodríguez, A., 2015. Roles of bacterial membrane vesicles. *Arch Microbiol* 197, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1042-7>
- Avila-Calderón, E.D., Ruiz-Palma, M. del S., Aguilera-Arreola, Ma.G., Velázquez-Guadarrama, N., Ruiz, E.A., Gomez-Lunar, Z., Witonsky, S., Contreras-Rodríguez, A., 2021. Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria: An Outlook on Biogenesis. *Front. Microbiol.* 12, 557902. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.557902>
- 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. *Mol Syst Biol* 2. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Bahadur, R., Chodiseti, P.K., Reddy, M., 2021. 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, e2101989118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2101989118>
- Baranowski, C., Welsh, M.A., Sham, L.-T., Eskandarian, H.A., Lim, H.C., Kieser, K.J., Wagner, J.C., McKinney, J.D., Fantner, G.E., Ioerger, T.R., Walker, S., Bernhardt, T.G., Rubin, E.J., Rego, E.H., 2018. Maturing Mycobacterium smegmatis peptidoglycan requires non-canonical crosslinks to maintain shape. *eLife* 7, e37516. <https://doi.org/10.7554/eLife.37516>
- Battesti, A., Majdalani, N., Gottesman, S., 2011. The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 189–213. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102946>

- Biarrotte-Sorin, S., Hugonnet, J.-E., Delfosse, V., Mainardi, J.-L., Gutmann, L., Arthur, M., Mayer, C., 2006. Crystal Structure of a Novel β -Lactam-insensitive Peptidoglycan Transpeptidase. *Journal of Molecular Biology* 359, 533–538. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.014>
- Chalabaev, S., Chauhan, A., Novikov, A., Iyer, P., Szczesny, M., Beloin, C., Caroff, M., Ghigo, J.-M., 2014. Biofilms Formed by Gram-Negative Bacteria Undergo Increased Lipid A Palmitoylation, Enhancing *In Vivo* Survival. *mBio* 5, e01116-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01116-14>
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M.A., Foster, S.J., Mak, T.W., Nuñez, G., Inohara, N., 2003. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 4, 702–707. <https://doi.org/10.1038/ni945>
- Chodiseti, P.K., Reddy, M., 2019. Peptidoglycan hydrolase of an unusual cross-link cleavage specificity contributes to bacterial cell wall synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 7825–7830. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816893116>
- Clifton, L.A., Skoda, M.W.A., Le Brun, A.P., Ciesielski, F., Kuzmenko, I., Holt, S.A., Lakey, J.H., 2015. Effect of Divalent Cation Removal on the Structure of Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Models. *Langmuir* 31, 404–412. <https://doi.org/10.1021/la504407v>
- Cordillot, M., Dubée, V., Triboulet, S., Dubost, L., Marie, A., Hugonnet, J.-E., Arthur, M., Mainardi, J.-L., 2013. *In Vitro* Cross-Linking of Mycobacterium tuberculosis Peptidoglycan by ϵ , δ -Transpeptidases and Inactivation of These Enzymes by Carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 5940–5945. <https://doi.org/10.1128/AAC.01663-13>
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
- Delhaye, A., Collet, J.-F., Laloux, G., 2016. Fine-Tuning of the Cpx Envelope Stress Response Is Required for Cell Wall Homeostasis in *Escherichia coli*. *mBio* 7, e00047-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00047-16>

- Dramsi, S., Magnet, S., Davison, S., Arthur, M., 2008. Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *FEMS Microbiol Rev* 32, 307–320. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00102.x>
- Dubée, V., Arthur, M., Fief, H., Triboulet, S., Mainardi, J.-L., Gutmann, L., Sollogoub, M., Rice, L.B., Ethève-Quellejeu, M., Hugonnet, J.-E., 2012a. Kinetic Analysis of *Enterococcus faecium* L, D -Transpeptidase Inactivation by Carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 3409–3412. <https://doi.org/10.1128/AAC.06398-11>
- Dubée, V., Triboulet, S., Mainardi, J.-L., Ethève-Quellejeu, M., Gutmann, L., Marie, A., Dubost, L., Hugonnet, J.-E., Arthur, M., 2012b. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* L, D -Transpeptidase Ldt_{Mt1} by Carbapenems and Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 4189–4195. <https://doi.org/10.1128/AAC.00665-12>
- Edoo, Z., Iannazzo, L., Compain, F., Li de la Sierra Gallay, I., van Tilbeurgh, H., Fonvielle, M., Bouchet, F., Le Run, E., Mainardi, J.-L., Arthur, M., Ethève-Quellejeu, M., Hugonnet, J.-E., 2018. Synthesis of Avibactam Derivatives and Activity on β -Lactamases and Peptidoglycan Biosynthesis Enzymes of *Mycobacteria*. *Chem. Eur. J.* 24, 8081–8086. <https://doi.org/10.1002/chem.201800923>
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2022. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method.
- Geiger, T., Pazos, M., Lara-Tejero, M., Vollmer, W., Galán, J.E., 2018. Peptidoglycan editing by a specific Ld-transpeptidase controls the muramidase-dependent secretion of typhoid toxin. *Nat Microbiol* 3, 1243–1254. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0248-x>
- Girardin, S.E., 2003. Nod1 Detects a Unique Muropeptide from Gram-Negative Bacterial Peptidoglycan. *Science* 300, 1584–1587. <https://doi.org/10.1126/science.1084677>
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J., 2003a. Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection. *Journal of Biological Chemistry* 278, 8869–8872. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200651200>
- Girardin, S.E., Travassos, L.H., Hervé, M., Blanot, D., Boneca, I.G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J., Mengin-Lecreulx, D., 2003b. Peptidoglycan Molecular Requirements Allowing

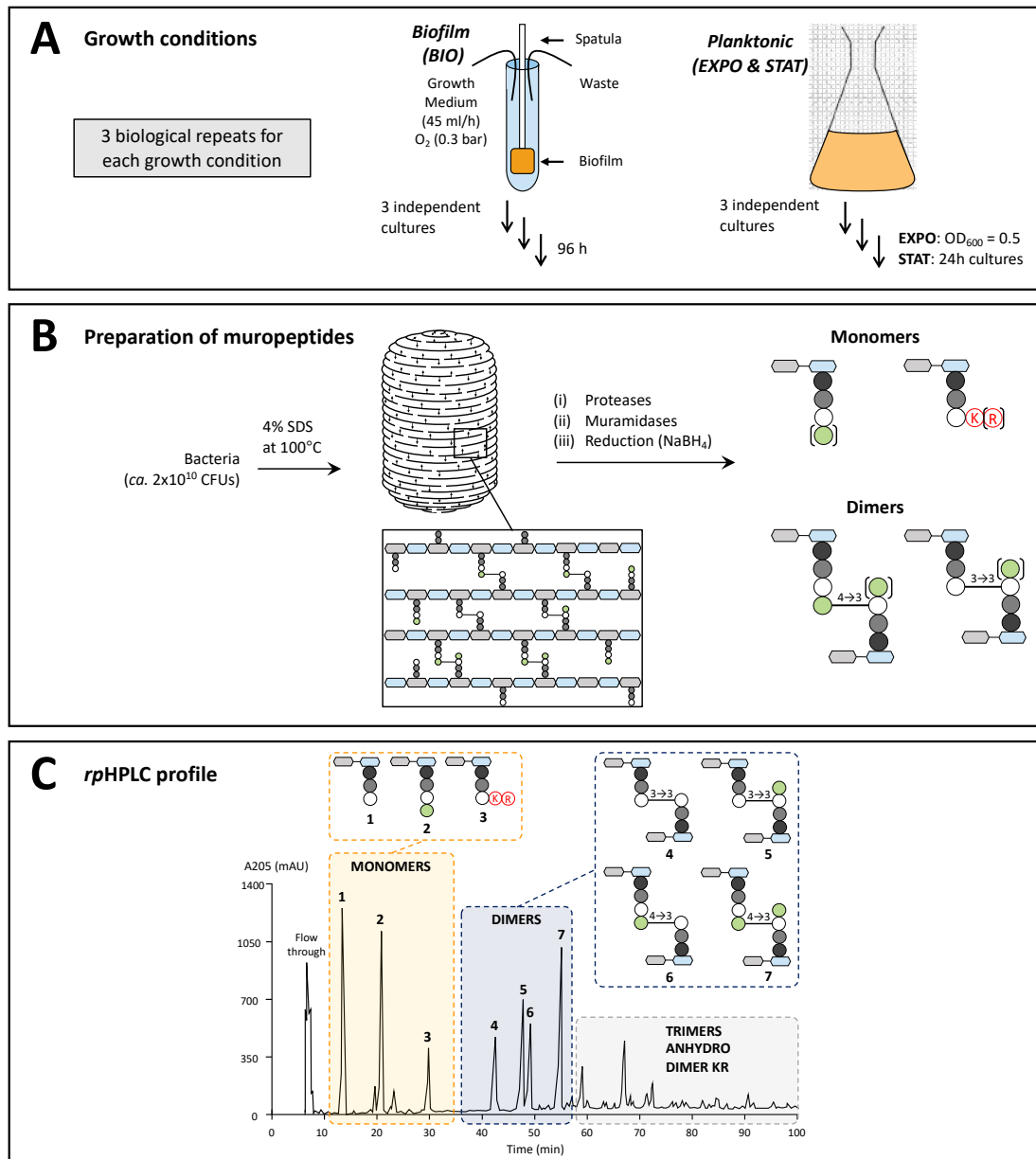
- Detection by Nod1 and Nod2. *Journal of Biological Chemistry* 278, 41702–41708.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M307198200>
- Gupta, R., Lavollay, M., Mainardi, J.-L., Arthur, M., Bishai, W.R., Lamichhane, G., 2010. The *Mycobacterium tuberculosis* protein LdtMt2 is a nonclassical transpeptidase required for virulence and resistance to amoxicillin. *Nat Med* 16, 466–469.
<https://doi.org/10.1038/nm.2120>
- Hugonnet, J.-E., Haddache, N., Veckerlé, C., Dubost, L., Marie, A., Shikura, N., Mainardi, J.-L., Rice, L.B., Arthur, M., 2014. Peptidoglycan Cross-Linking in Glycopeptide-Resistant Actinomycetales. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 1749–1756.
<https://doi.org/10.1128/AAC.02329-13>
- Hugonnet, J.-E., Mengin-Lecreulx, D., Monton, A., den Blaauwen, T., Carbonnelle, E., Veckerlé, C., Brun, Y., V., 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, e19469.
<https://doi.org/10.7554/eLife.19469>
- Irving, S.E., Choudhury, N.R., Corrigan, R.M., 2021. The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 19, 256–271.
<https://doi.org/10.1038/s41579-020-00470-y>
- Lavollay, M., Arthur, M., Fourgeaud, M., Dubost, L., Marie, A., Riegel, P., Gutmann, L., Mainardi, J.-L., 2009. The β -lactam-sensitive D, D-carboxypeptidase activity of Pbp4 controls the L, D and D, D transpeptidation pathways in *Corynebacterium jeikeium*: β -Lactam resistance in *C. jeikeium*. *Molecular Microbiology* 74, 650–661.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06887.x>
- Magnet, S., Bellais, S., Dubost, L., Fourgeaud, M., Mainardi, J.-L., Petit-Frère, S., Marie, A., Mengin-Lecreulx, D., Arthur, M., Gutmann, L., 2007. Identification of the L, D -Transpeptidases Responsible for Attachment of the Braun Lipoprotein to *Escherichia coli* Peptidoglycan. *J Bacteriol* 189, 3927–3931. <https://doi.org/10.1128/JB.00084-07>
- 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. <https://doi.org/10.1128/JB.00025-08>

- Mainardi, J.-L., Fourgeaud, M., Hugonnet, J.-E., Dubost, L., Brouard, J.-P., Ouazzani, J., Rice, L.B., Gutmann, L., Arthur, M., 2005. A Novel Peptidoglycan Cross-linking Enzyme for a β -Lactam-resistant Transpeptidation Pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 38146–38152. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507384200>
- Mainardi, J.-L., Hugonnet, J.-E., Rusconi, F., Fourgeaud, M., Dubost, L., Mouri, A.N., Delfosse, V., Mayer, C., Gutmann, L., Rice, L.B., Arthur, M., 2007. Unexpected Inhibition of Peptidoglycan LD-Transpeptidase from *Enterococcus faecium* by the β -Lactam Imipenem. *Journal of Biological Chemistry* 282, 30414–30422. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704286200>
- Mainardi, J.-L., Legrand, R., Arthur, M., Schoot, B., van Heijenoort, J., Gutmann, L., 2000. Novel Mechanism of β -Lactam Resistance Due to Bypass of DD-Transpeptidation in *Enterococcus faecium*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 16490–16496. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909877199>
- Mainardi, J.-L., Morel, V., Fourgeaud, M., Cremniter, J., Blanot, D., Legrand, R., Fréhel, C., Arthur, M., van Heijenoort, J., Gutmann, L., 2002. Balance between Two Transpeptidation Mechanisms Determines the Expression of β -Lactam Resistance in *Enterococcus faecium*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 35801–35807. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204319200>
- Morè, N., Martorana, A.M., Biboy, J., Otten, C., Winkle, M., Serrano, C.K.G., Montón Silva, A., Atkinson, L., Yau, H., Breukink, E., den Blaauwen, T., Vollmer, W., Polissi, A., 2019. Peptidoglycan Remodeling Enables *Escherichia coli* To Survive Severe Outer Membrane Assembly Defect. *mBio* 10, e02729-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02729-18>
- Peltier, J., Courtin, P., El Meouche, I., Lemée, L., Chapot-Chartier, M.-P., Pons, J.-L., 2011. *Clostridium difficile* Has an Original Peptidoglycan Structure with a High Level of N-Acetylglucosamine Deacetylation and Mainly 3-3 Cross-links. *Journal of Biological Chemistry* 286, 29053–29062. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.259150>
- Pisabarro, A.G., de Pedro, M.A., Vázquez, 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. <https://doi.org/10.1128/jb.161.1.238-242.1985>

- Sacco, E., Cortes, M., Josseaume, N., Bouchier, C., Dubée, V., Hugonnet, J.-E., Mainardi, J.-L., Rice, L.B., Arthur, M., 2015. Mutation Landscape of Acquired Cross-Resistance to Glycopeptide and β -Lactam Antibiotics in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 5306–5315. <https://doi.org/10.1128/AAC.00634-15>
- Sacco, E., Cortes, M., Josseaume, N., Rice, L.B., Mainardi, J.-L., Arthur, M., 2014. Serine/Threonine Protein Phosphatase-Mediated Control of the Peptidoglycan Cross-Linking L, D - Transpeptidase Pathway in *Enterococcus faecium*. *mBio* 5, e01446-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01446-14>
- Sacco, E., Hugonnet, J.-E., Josseaume, N., Cremniter, J., Dubost, L., Marie, A., Patin, D., Blanot, D., Rice, L.B., Mainardi, J.-L., Arthur, M., 2010. Activation of the l,d-transpeptidation peptidoglycan cross-linking pathway by a metallo-d,d-carboxypeptidase in *Enterococcus faecium*. *Molecular Microbiology* 75, 874–885. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07014.x>
- Sanders, A.N., Pavelka, M.S., 2013. Phenotypic analysis of *Escherichia coli* mutants lacking l,d-transpeptidases. *Microbiology* 159, 1842–1852. <https://doi.org/10.1099/mic.0.069211-0>
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., Charlier, P., 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32, 234–258. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
- Sun, J., Rutherford, S.T., Silhavy, T.J., Huang, K.C., 2022. Physical properties of the bacterial outer membrane. *Nat Rev Microbiol* 20, 236–248. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00638-0>
- Triboulet, S., Dubée, V., Lecoq, L., Bougault, C., Mainardi, J.-L., Rice, L.B., Ethève-Quellejeu, M., Gutmann, L., Marie, A., Dubost, L., Hugonnet, J.-E., Simorre, J.-P., Arthur, M., 2013. Kinetic Features of L,D-Transpeptidase Inactivation Critical for β -Lactam Antibacterial Activity. *PLoS ONE* 8, e67831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067831>
- Voedts, H., Dorchêne, D., Lodge, A., Vollmer, W., Arthur, M., Hugonnet, J., 2021. Role of endopeptidases in peptidoglycan synthesis mediated by alternative cross-linking enzymes in *Escherichia coli*. *EMBO J* 40. <https://doi.org/10.15252/emboj.2021108126>

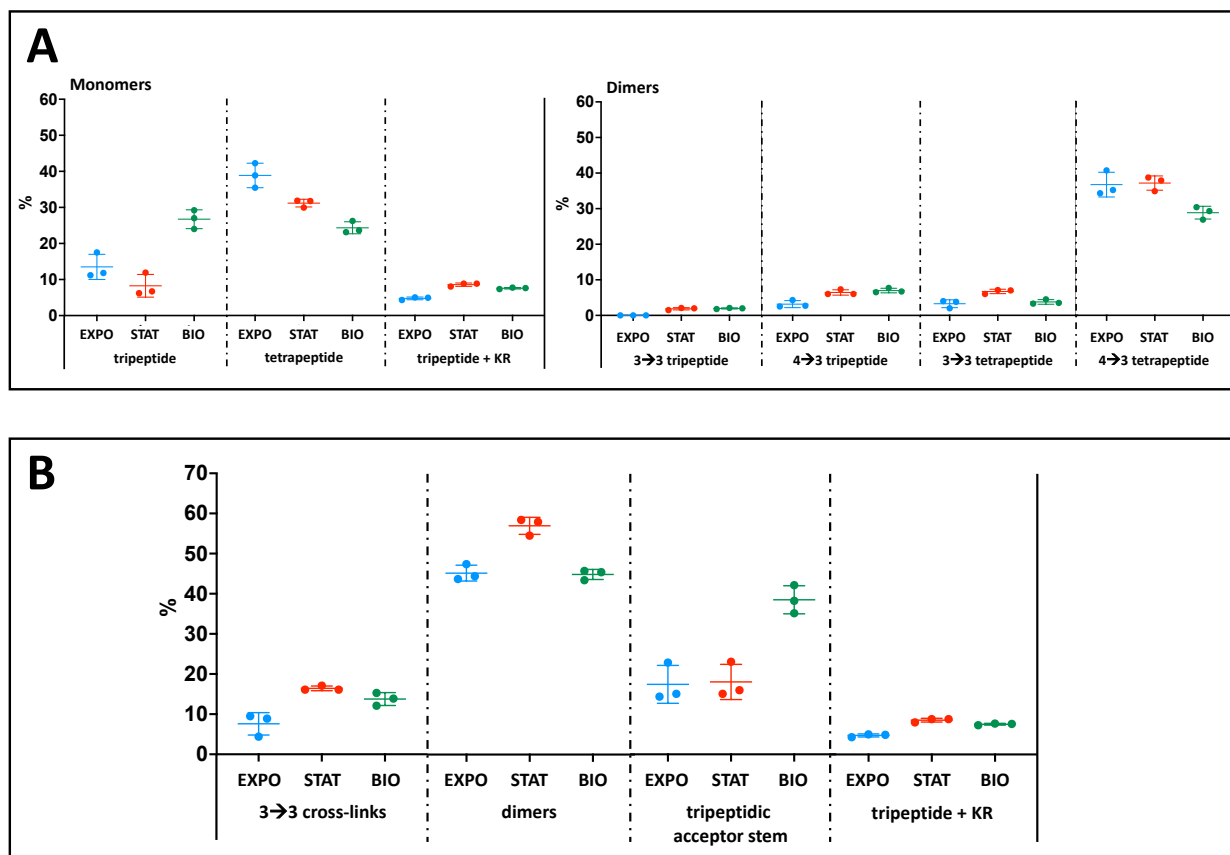
Winkle, M., Hernández-Rocamora, V.M., Pallela, K., Goodall, E.C.A., Martorana, A.M., Gray, J., Henderson, I.R., Polissi, A., Vollmer, W., 2021. DpaA Detaches Braun's Lipoprotein from Peptidoglycan. *mBio* 12, e00836-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.00836-21>

Wolf, A.J., Underhill, D.M., 2018. Peptidoglycan recognition by the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 18, 243–254. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.136>

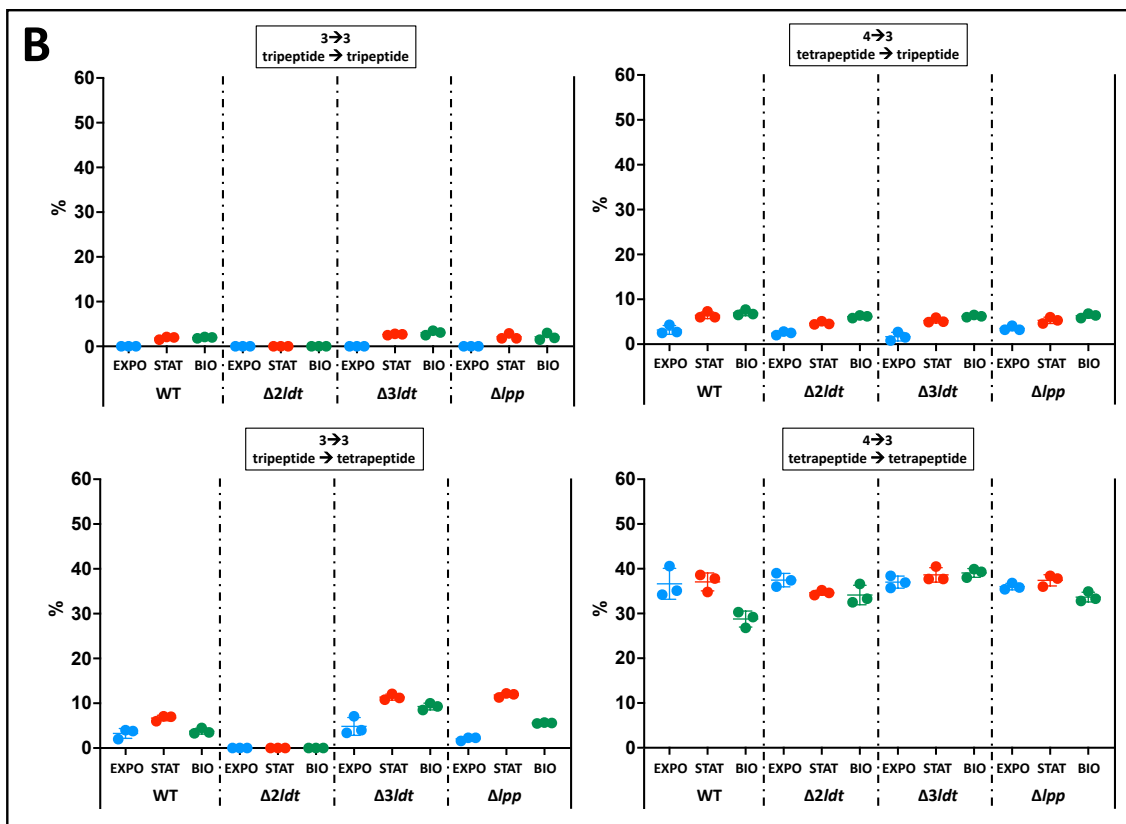
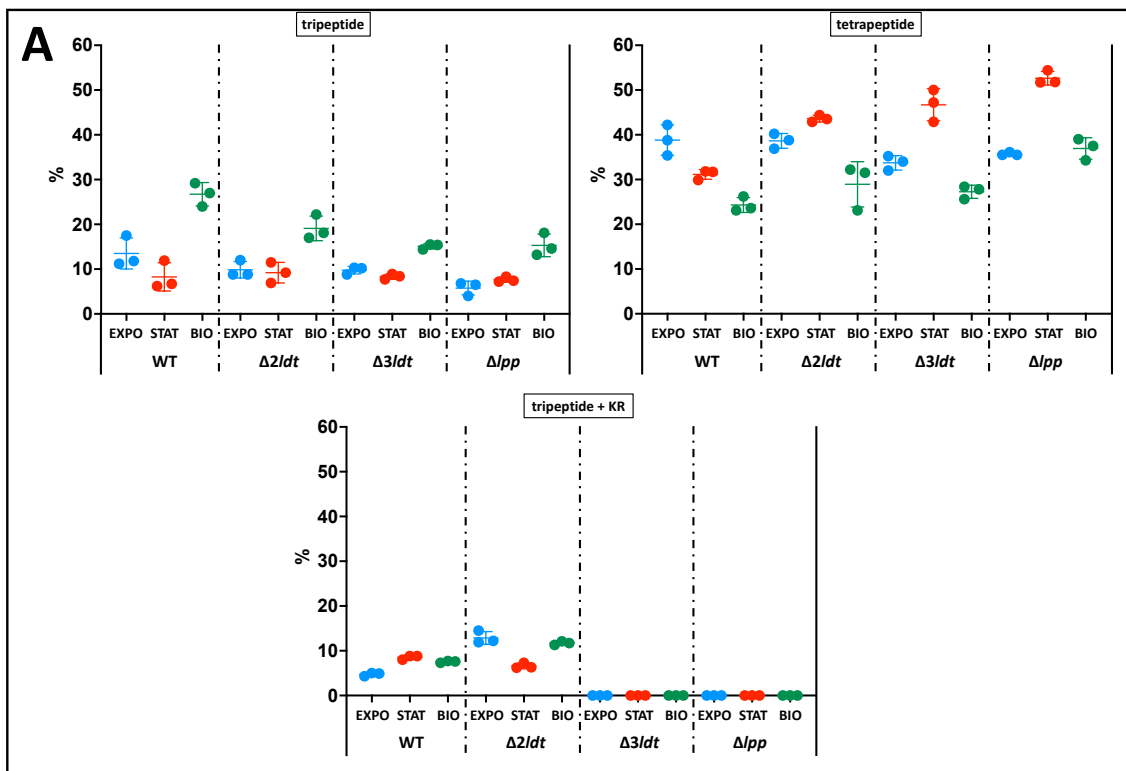


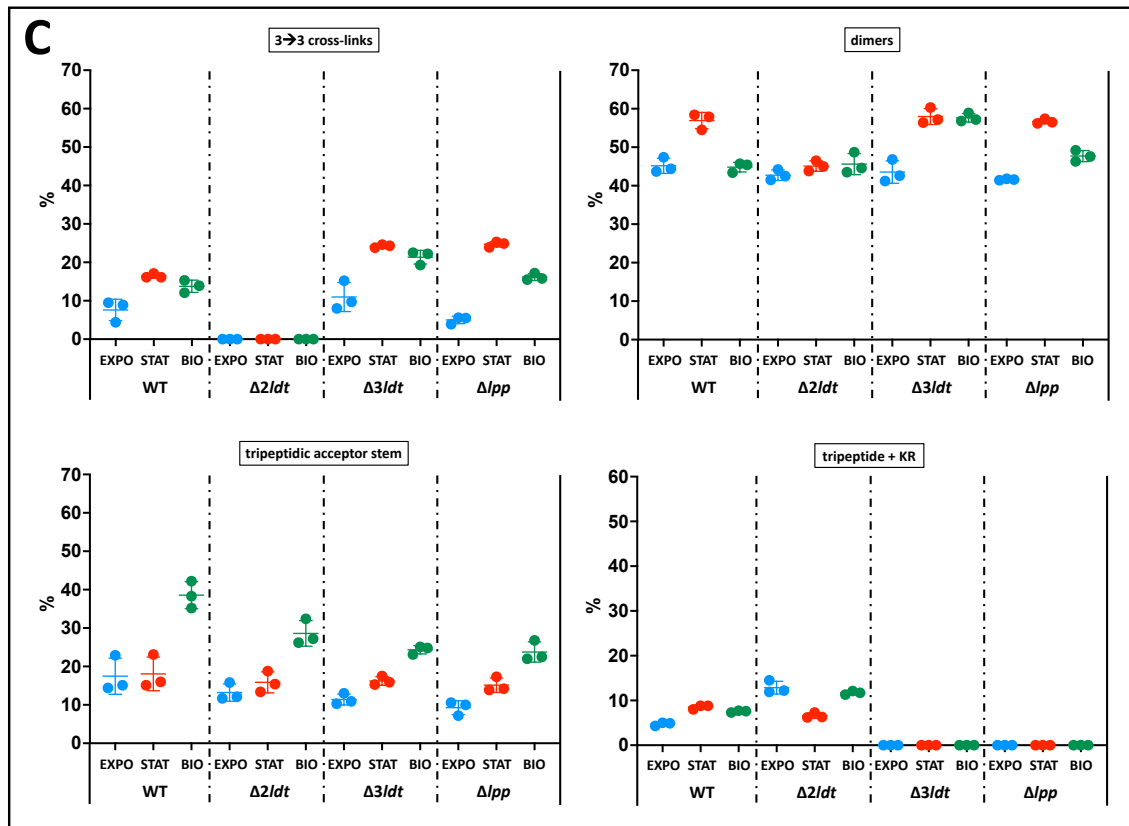
Supplementary Fig. S1. Study design for peptidoglycan analysis. (A) *E. coli* BW25113 and derivatives were grown in M63B1 medium [KH₂PO₄ 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 15 mM, MgSO₄ 0.8 mM, vitamin B1 3 μM, pH 7.4] containing glucose (0.4%) or in Lysogeny Broth (LB Miller). Continuous flow microfermentors containing a removable glass spatula were used for biofilm development. The glass spatulas were inoculated for 2 min by dipping in an overnight culture adjusted to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 1.0. Bacteria were recovered from fermenters incubated for 96 h at 37°C. Planktonic *E. coli* BW25113 was grown to an OD₆₀₀ of 0.5 (EXPO, exponential phase of growth) or during 24h (STAT, stationary phase of growth). Incubation was performed at 37°C 180 rpm. For each condition, three biological replicates were performed starting the inoculation of three independent precultures with isolated colonies. **(B)** Peptidoglycan was extracted from bacteria by the hot SDS procedure. Proteins covalently linked to peptidoglycan, including the Braun lipoprotein, were digested with pronase and trypsin.

Peptidoglycan was digested with muramidases (lysozyme and mutanolysin), which hydrolyze the $\beta 1 \rightarrow 4$ bond between MurNAc and GlcNAc. MurNAc was reduced to muramitol with sodium borohydride. **(C)** Reduced muropeptides were separated by *rp*HPLC on a C18 column, UV detection was performed at 205 nm and the relative abundance of peptidoglycan fragments was estimated as the percentage of the total integrated area.



Supplementary Figure S2. Peptidoglycan analysis of *E. coli* BW25113 grown in planktonic and in biofilm in rich medium (LB Miller). (A) Relative abundance of monomers and dimers in the peptidoglycan of *E. coli* grown in exponential phase (EXPO, blue dots), stationary phase (STAT, red dots) and biofilm (BIO, green dots). (B) Characteristics of peptidoglycan isolated from bacteria grown in biofilm or in planktonic form. Proportion of dimers with 3→3 cross-links among all dimers, proportion of monomers among all mucopeptides, proportion of mucopeptides with a tripeptide acceptor stem among all mucopeptides and proportion of mucopeptides containing residues of the Braun lipoprotein among all mucopeptides. The horizontal line indicates the mean % value and the vertical line indicates the standard deviation. EXPO, exponentially growing *E. coli* ($OD_{600} = 0.5$); STAT, *E. coli* grown for 24h to the stationary phase; BIO, BW25113 grown for 96 h in biofilm in microfermentors.





Supplementary Figure S3. Peptidoglycan analysis of *E. coli* BW25113 and mutants grown in planktonic and in biofilm in rich medium (LB Miller). (A) Relative abundance of monomers in the peptidoglycan of the wild-type (WT), $\Delta 2ldt$ ($\Delta ycbB \Delta ynhG$, no 3→3 cross-links), $\Delta 3ldt$ ($\Delta erfK \Delta ybiS \Delta ycfS$, no anchoring of the Braun lipoprotein) and Δlpp (no Braun lipoprotein) strains, grown in exponential phase (EXPO, blue dots), stationary phase (STAT, red dots) and biofilm (BIO, green dots). **(B)** Relative abundance of dimers in the peptidoglycan of the latter strains. **(C)** Characteristics of peptidoglycan isolated from the latter strains. Proportion of dimers with 3→3 cross-links among all dimers, proportion of monomers among all muropeptides, proportion of muropeptides with a tripeptide acceptor stem among all muropeptides and proportion of muropeptides containing residues of the Braun lipoprotein among all muropeptides. The horizontal line indicates the mean % value and the vertical line indicates the standard deviation. EXPO, exponentially growing *E. coli* ($OD_{600} = 0.5$); STAT, *E. coli* grown for 24h to the stationary phase; BIO, BW25113 grown for 96 h in biofilm in microfermentors.

Supplementary Table S1. Impact of *ltd* gene deletions on antibiotic susceptibility

Disk (loading dose)	MH		0.25 µg/ml amoxicillin		0.01 µg/ml ceftriaxone		2 % SDS		10 mg/ml lysazyme		Bile salts 2 mg/ml		0.25 mg/ml EDTA	
	WT	Δ6	WT	Δ6	WT	Δ6	WT	Δ6	WT	Δ6	WT	Δ6	WT	Δ6
Ampicillin (10 µg)	24	25	24	24	25	25	22	22	25	26	23	24	26	29
Amoxicillin (20 µg)/Clavulanic acid 10 (µg)	23	25	25	24	25	25	19	25	24	23	25	24	30	31
Cephalexin (30 µg)	22	22	21	23	26	26	20	21	22	20	21	21	23	24
Cefamandole (30 µg)	36	38	37	38	31	35	32	40	32	30	34	35	39	35
Cefoxitin (30 µg)	33	32	30	33	33	33	32	35	28	29	30	33	36	40
Cefotaxime (5 µg)	38	40	37	38	37	38	34	39	33	31	34	37	40	40
Aztreonam (30 µg)	42	42	40	40	40	42	39	42	36	35	39	40	42	40
Vancomycin (5 µg)	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	9	<6
Ertapenem (10 µg)	40	40	40	40	39	40	40	40	37	36	40	40	40	40
Mecillinam (10 µg)	31	31	31	31	32	30	26	27	33	28	32	32	35	33
Amikacin (30 µg)	30	29	29	29	29	30	19	17	29	23	30	29	29	30
Nalidixic acid (30 µg)	28	29	27	29	25	27	20	23	25	27	26	27	30	33
Erythromycin (15 µg)	19	22	18	23	20	23	8	6	18	18	19	23	23	28
Sulfamethoxazole (23.75 µg)/Trimethoprim (1.25 µg)	35	34	33	34	33	34	29	30	32	35	33	35	38	39
Fosfomicin (200 µg)	36	41	34	39	36	42	34	40	38	40	37	40	40	40
Colistine (50 µg)	21	21	20	20	21	21	23	16	25	23	29	26	21	20
Ertapenem (1 µg)	30	30	30	30	31	32	30	30	29	29	30	31	30	30
Imipenem (1 µg)	20	19	19	19	20	20	21	19	19	19	20	19	19	18
Meropenem (1 µg)	27	28	27	27	28	29	28	27	26	26	27	28	26	26

Data are the medians of three biological repeats.

<6 when bacteria grew at the contact of the disk.

Increases in the diameters of the inhibition zones greater than 5 mm (increases in susceptibility) associated with the deletion of the six *ltd* genes are highlighted in blue.

Decreases in the diameters of the inhibition zones greater than 5 mm (increases in resistance) associated with the deletion of the six *ltd* genes are highlighted in yellow.

Supplementary Table S2. Impact of supplementation of the MH medium by β-lactams, SDS, lysozyme, bile salts, or EDTA on drug susceptibility

Disk (loading dose)	Variations in the diameters of the inhibition zones (mm) associated with supplementation of the MH medium												
	0.25 µg/ml amoxicillin		0.01 µg/ml ceftriaxone		2 % SDS		10 mg/ml lysozyme		Bile salts 2 mg/ml		0.25 mg/ml EDTA		
	WT	Δ6	WT	Δ6	WT	Δ6	WT	Δ6	WT	Δ6	WT	Δ6	
Amoxicillin (10 µg)	0	1	-1	0	2	3	-1	-1	-1	1	1	-2	-4
Amoxicillin (20 µg)/Clavulanic acid 1.0 (µg)	-2	1	-2	0	4	0	-1	2	-2	1	1	-7	-6
Cephalexin (30 µg)	1	-1	-4	-4	2	1	0	2	1	1	1	-1	-2
Cefamandole (30 µg)	-1	0	5	3	4	-2	4	8	2	3	3	-3	3
Cefoxitin (30 µg)	3	-1	0	-1	1	-3	5	3	3	-1	-1	-3	-8
Cefotaxime (5 µg)	1	2	1	2	4	1	5	9	4	3	3	-2	0
Aztreonam (30 µg)	2	2	2	0	3	0	6	7	0	3	0	0	2
Vancomycin (5 µg)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>3	0
Ertapenem (10 µg)	0	0	1	0	0	0	3	4	0	0	0	0	0
Mecillinam (10 µg)	0	0	-1	1	5	0	-2	3	-1	-1	-1	-2	-2
Amikacin (30 µg)	1	0	0	-1	0	0	1	6	2	0	0	1	-1
Nalidixic acid (30 µg)	1	0	3	2	8	6	3	6	2	2	2	-2	-4
Erythromycin (15 µg)	1	-1	-1	-1	11	>16	1	4	4	0	-1	-4	-6
Sulfamethoxazole (23.75 µg)/Trimethoprim (1.25 µg)	2	0	2	0	6	4	3	-1	2	2	-1	-3	-5
Fosfomycin (200 µg)	2	2	0	-1	2	1	-2	1	-1	1	-4	-4	1
Colistine (50 µg)	1	1	0	0	-2	5	-4	-2	-1	-1	0	0	1
Ertapenem (1 µg)													
Meropenem (1 µg)													

Differences were calculated from data appearing in Supplementary Table SX (*i.e.*, diameter for MH minus diameter for supplemented MH). Differences greater than 5 mm (decreases in susceptibility) associated with supplementation of medium are highlighted in red. Differences smaller than -5 mm (increases in susceptibility) associated with supplementation of medium are highlighted in green.

Supplementary Table S3. Characteristics and origin of *Escherichia coli* strains used in this study.

Strain	Characteristics	Origin
<i>E. coli</i> BW25113	$\Delta(\text{araD-araB})567 \Delta(\text{rhaD-rhaB})568$ $\Delta\text{lacZ4787} (::\text{rrnB-3}) \text{hsdR514 rph-1}$	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta 2\text{ldt}$	$\Delta\text{ycbB } \Delta\text{ynhG}$	This study
<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta 3\text{ldt}$	$\Delta\text{ybiS } \Delta\text{erfK } \Delta\text{ycfS}$	This study
<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta 6\text{ldt}$	$\Delta\text{ycbB } \Delta\text{ynhG } \Delta\text{ybiS } \Delta\text{erfK } \Delta\text{ycfS } \Delta\text{yafK}$	This study
<i>E. coli</i> BW25113 Δpp		This study

Supplementary Table S4. Characteristics and origin of the plasmids used in this study.

Plasmid	Characteristics	Origin
pKD46	λ -red expression under control of arabinose-inducible promoter, temperature-sensitive, Ampr	(Datsenko and Wanner, 2000)

DISCUSSION

1. Étude comparative des LDT produites par différentes espèces

Un nombre croissant de L,D-transpeptidases contenant un domaine YkuD a été identifié ces dernières années chez une grande diversité d'espèces bactériennes. Dans des conditions standards de laboratoire, l'importance de ces LDT est très variable. Elles ne sont par exemple pas essentielles chez *E. coli* et *P. aeruginosa*, mais leur rôle prédomine chez d'autres bactéries, où leur inactivation a des conséquences phénotypiques plus évidentes. C'est le cas des mycobactéries (environ 80% de ponts de type 3→3) et *Agrobacterium tumefaciens* (plus de 50% de ponts de type 3→3) (Lavollay *et al.*, 2008, 2011; Kumar *et al.*, 2012). Chez ces bactéries, les LDT semblent jouer un rôle important dans la croissance, le maintien de la forme et la virulence (Cameron *et al.*, 2014; Baranowski *et al.*, 2018). De nombreuses bactéries possèdent plusieurs paralogues des LDT et plusieurs fonctions leur ont été associées (Aliashkevich and Cava, 2022).

Dans le premier article, nous montrons que *P. aeruginosa* produit un représentant de chacune des trois grandes fonctions catalytiques associées aux LDT. Ldt_{Pae1} catalyse la formation des ponts de type 3→3, Ldt_{Pae2} ancre la lipoprotéine OprI (homologue de la Lpp de *E. coli*) au peptidoglycane, et Ldt_{Pae3} hydrolyse cette liaison. Les fonctions de Ldt_{Pae1} et Ldt_{Pae2} ont pu être explorées en utilisant deux approches complémentaires, l'une s'appuyant sur une perte de fonction, l'autre sur un gain. Premièrement, la délétion chromosomique des gènes codant pour ldt_{Pae1} ou ldt_{Pae2} a permis d'identifier les muropeptides qui ne sont plus produits par les mutants. Deuxièmement, l'expression hétérologue de ces deux gènes dans une souche de *E. coli* Δldt (chez qui toutes les LDT ont été inactivées) a permis d'observer que ces enzymes étaient fonctionnelles chez cet hôte hétérologue. La formation de ponts de type 3→3 a également pu être observée *in vitro* en incubant Ldt_{Pae1} purifiée avec du térapeptide. De plus, l'ajout de D-Met au mélange réactionnel a permis de montrer que Ldt_{Pae1} était aussi capable de catalyser l'échange de la D-Ala en position 4 du térapeptide par la D-Met.

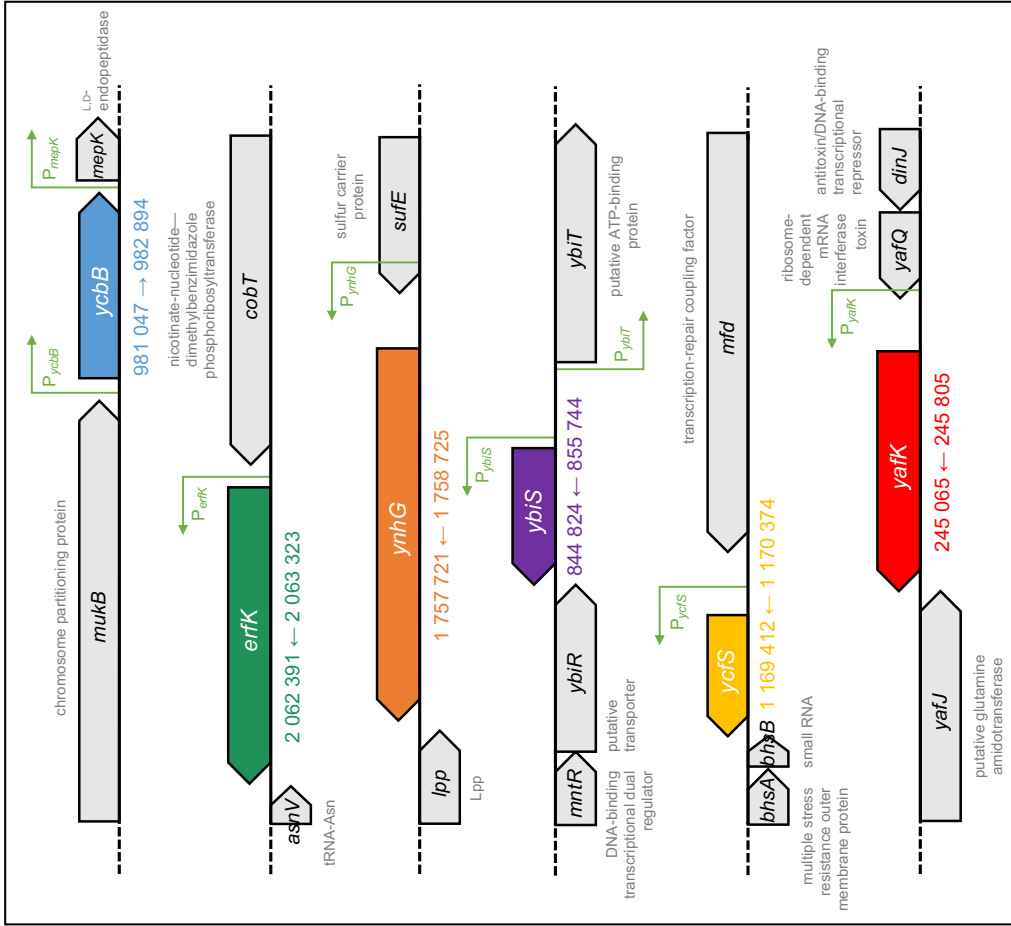
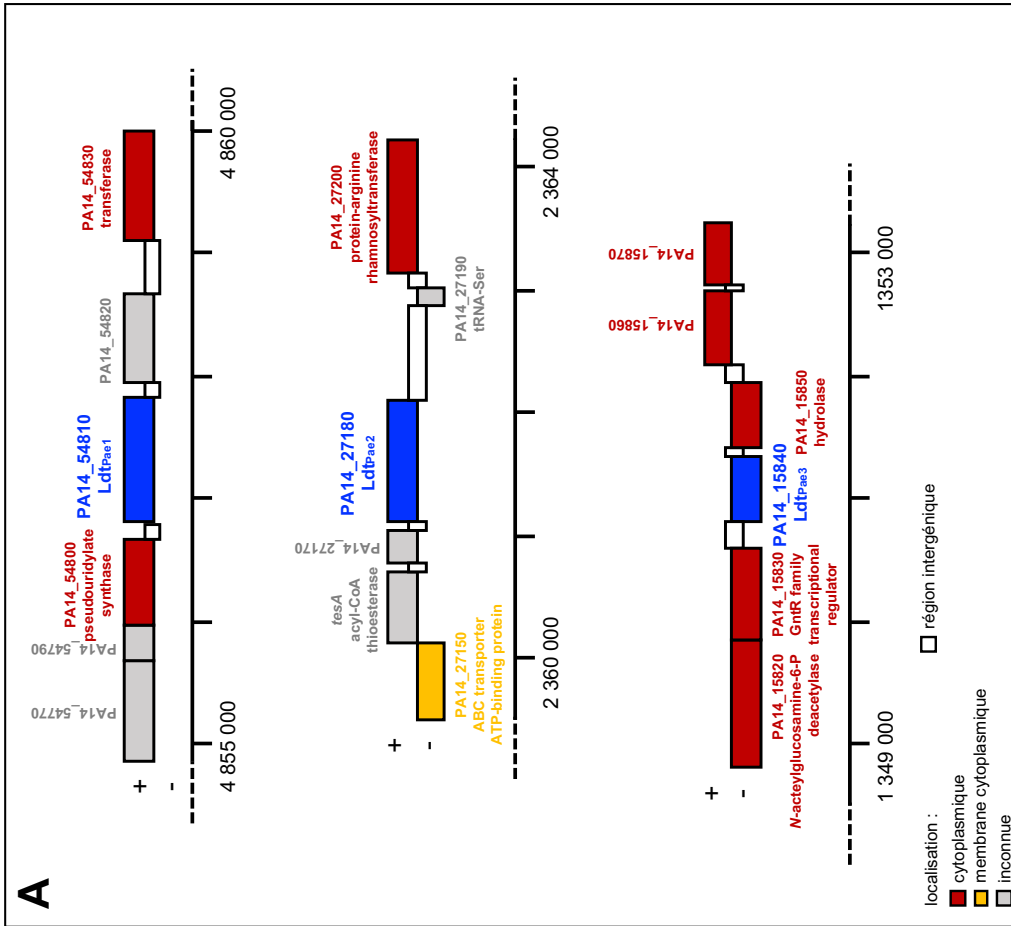
En se basant à la fois sur l'absence d'une activité de formation de liaisons amides (formation de ponts de type 3→3 et ancrage de OprI au peptidoglycane) et sur la proximité phylogénétique entre Ldt_{Pae3} et la LDT YafK de *E. coli*, nous avons provisoirement attribué une fonction d'hydrolase à Ldt_{Pae3} . Celle-ci permettrait de cliver la liaison entre OprI et les tiges tripeptidiques du peptidoglycane. Cette fonction n'a été mise en évidence que très récemment chez *E. coli* dans deux études indépendantes publiées à quelques semaines d'intervalle (Bahadur *et al.*, 2021; Winkle *et al.*, 2021). L'inactivation du gène codant pour *yafK* n'entraîne aucun changement dans la nature des muropeptides détectés lors de l'analyse du peptidoglycane, ne donnant aucun indice sur une éventuelle piste à suivre. Dans leur étude, Bahadur *et al.* ont d'abord remarqué que la surexpression du gène codant pour *yafK* compensait partiellement la délétion des gènes codant pour MepS et MepK, deux endopeptidases jouant un rôle lors de la polymérisation du peptidoglycane. Ils ont également observé une absence de tiges tripeptidiques

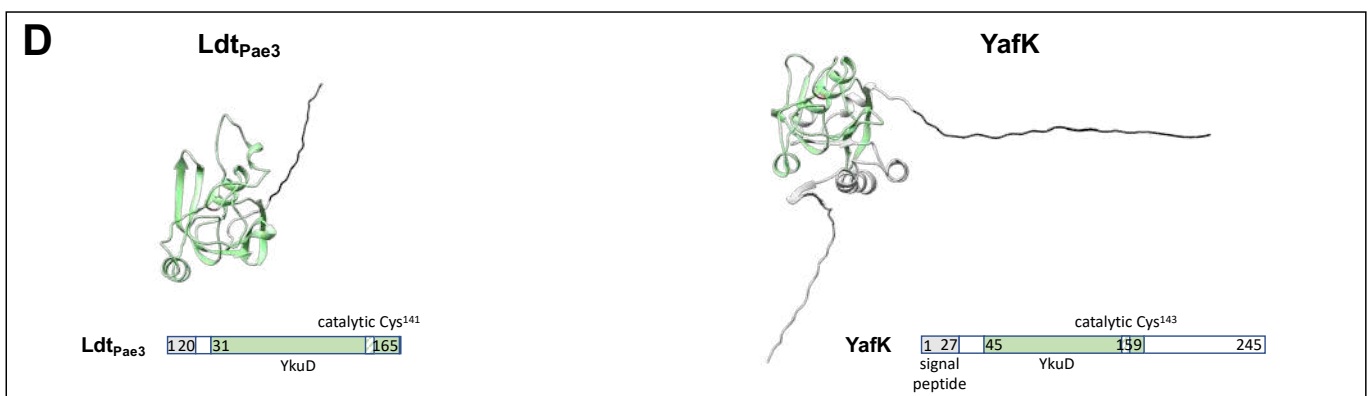
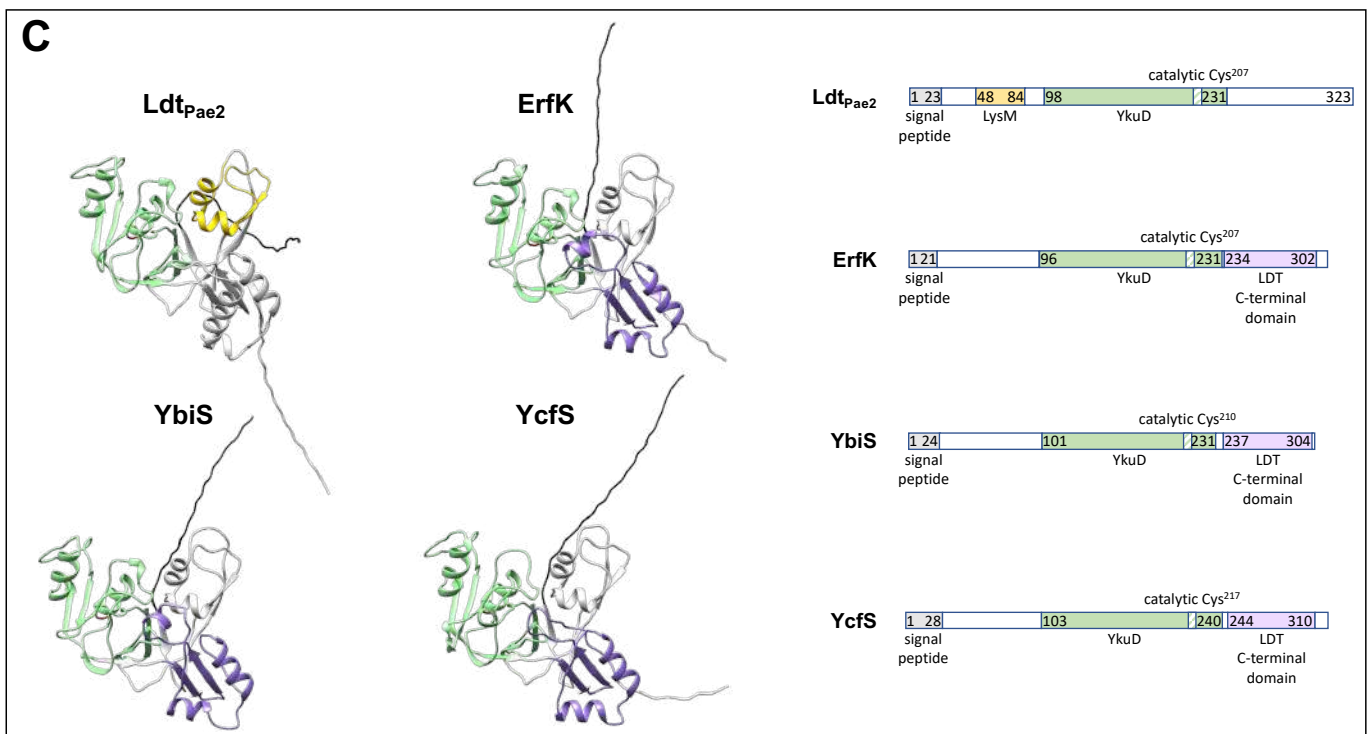
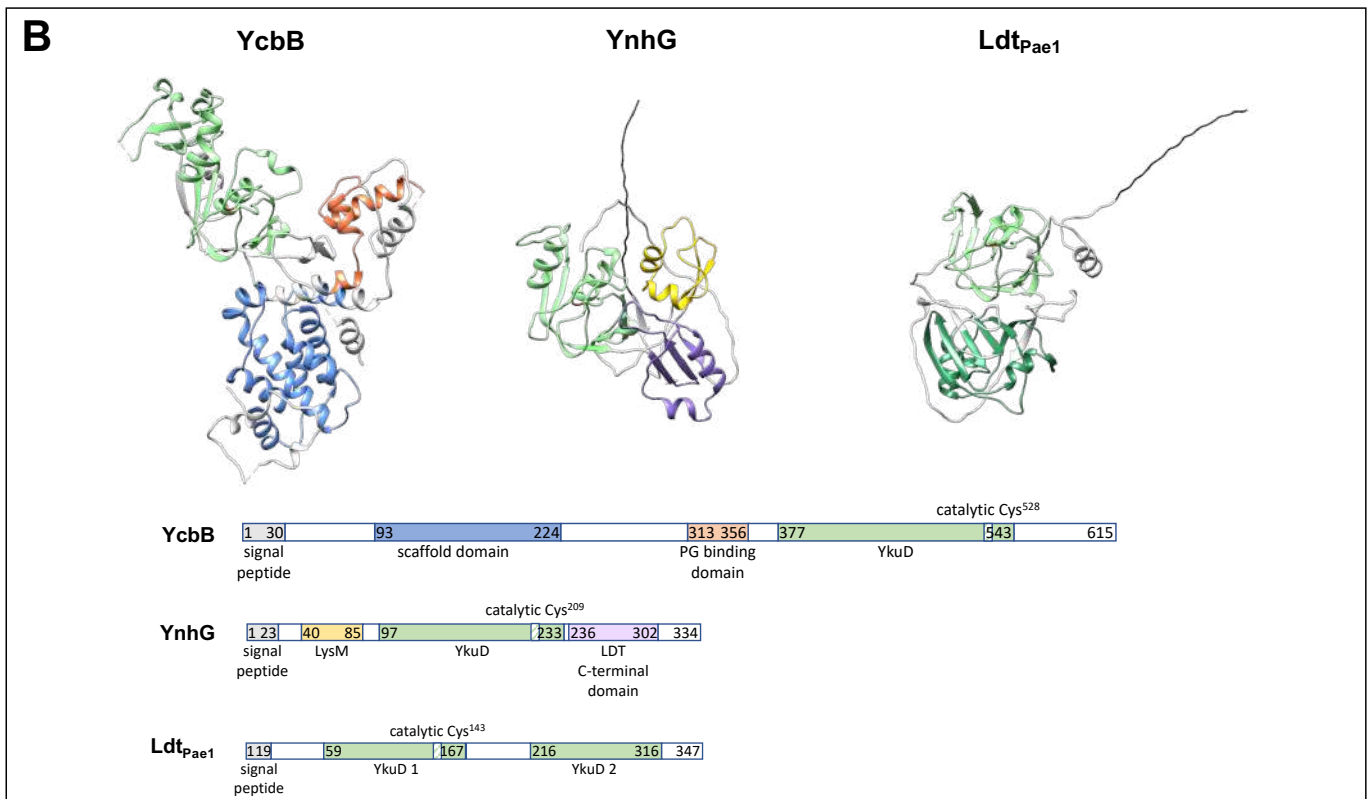
substituées par les résidus lysine et arginine en position C-terminale de la Lpp (Tri-KR) lorsque *yafK* était surexprimé dans la souche sauvage, suggérant ainsi son rôle dans la modulation du degré de liaison entre la Lpp et le peptidoglycane. Cette hypothèse a été confirmée en mettant en évidence l'activité hydrolase de la protéine YafK purifiée. De leur côté, Winkle *et al.* ont d'abord investigué, les activités L,D-transpeptidase et L,D-carboxypeptidase de YafK purifiée, sans succès. Ils ont alors pensé qu'au lieu de former des liaisons, YafK pourrait hydrolyser les liaisons générées par d'autres LDT. Les approches expérimentales sont sensiblement les mêmes dans les deux articles, et celles-ci pourraient être utilisées pour confirmer que Ldt_{Pac3} possède également une activité hydrolase. Par exemple, l'incubation de Ldt_{Pac3} purifiée avec le monomère Tri-KR ou le dimère Tetra-Tri-KR pourraient permettre d'observer l'apparition de Tri ou de Tetra-Tri. Ldt_{Pac3} purifiée pourrait aussi être incubée avec des sacculi d'une souche de *P. aeruginosa* PA14 Δ ldt_{Pac3} afin de détecter un éventuel relargage de OprI par Western Blot. Les premières tentatives n'ont pas permis de purifier Ldt_{Pac3} en quantités suffisantes et le protocole de purification est en cours d'optimisation.

Tout au long de la thèse, l'étude simultanée de *E. coli* et de *P. aeruginosa* m'a permis de relever un certain nombre de similarités et de différences entre les LDT des deux espèces bactériennes. Leur nombre n'est pas conservé, puisque *E. coli* possède six paralogues des *ldt* et *P. aeruginosa* en possède trois. L'environnement des gènes codant pour chacune des LDT n'est pas non plus conservé (Figure 18A). Il semble cependant que les deux espèces produisent un représentant de chacune des trois grandes fonctions catalytiques associées au domaine YkuD conservé, à savoir la formation de ponts de type 3→3 (YcbB et YnhG chez *E. coli* ; Ldt_{Pac1} chez *P. aeruginosa*), l'ancrage de la lipoprotéine Lpp ou OprI au peptidoglycane (YbiS, ErfK et YcfS chez *E. coli* ; Ldt_{Pac2} chez *P. aeruginosa*) et l'hydrolyse de la liaison entre la lipoprotéine et le peptidoglycane (YafK chez *E. coli* ; probablement Ldt_{Pac3} chez *P. aeruginosa*). La structure chimique du peptidoglycane est la même chez les deux espèces bactériennes et nos analyses n'ont pas permis de relever la présence de mucopeptides particuliers dans les conditions de croissance étudiées. La présence de ponts de type 3→3 n'a pas été détectée chez *P. aeruginosa* en phase exponentielle de croissance en milieu riche (LB). La proportion relative de ces ponts pour le milieu LB est d'environ 16 % en phase stationnaire et 14 % en biofilm. Chez *E. coli*, toujours en milieu LB, on compte environ 8 % de ponts de type 3→3 en phase exponentielle, 16 % en phase stationnaire et 14 % en biofilm dans les mêmes conditions. Chez les deux espèces bactériennes, l'absence de la lipoprotéine ou des LDT permettant son ancrage au peptidoglycane est associée à une hypersensibilité à l'activité bactéricide de l'EDTA. La sensibilité aux antibiotiques a été testée chez *E. coli* et chez *P. aeruginosa* et n'est pas affectée par la présence ou par l'absence des LDT dans les deux cas. Les LDT ne contribuent donc ni à la croissance des différentes souches, ni à l'efficacité de la barrière de perméabilité médiée par la membrane externe en présence de concentrations subinhibitrices de β -lactamines chez les souches sensibles à ces antibiotiques. Nous avons également observé que Ldt_{Pac1} et YnhG ne pouvaient pas contourner l'activité des PLP inhibés par les β -lactamines dans la réticulation du peptidoglycane, comme

c'est le cas pour YcbB (Hugonnet *et al.*, 2016). Cette différence pourrait s'expliquer par la présence de multiples domaines qui pourraient interagir avec les complexes de polymérisation du peptidoglycane dans YcbB (Figure 18B). De tels domaines sont absent de Ldt_{pae1} et YnhG.

Le logiciel d'intelligence artificielle Alphafold2 a permis d'obtenir des prédictions de la structure des LDT de *E. coli* et de *P. aeruginosa* à partir de leurs séquences en acides aminés (Jumper *et al.*, 2021). Ces structures sont présentées dans la Figure 18B, C et D, où les LDT ont été classées selon les trois grandes fonctions qui leur ont été attribuées. Parmi les neuf LDT étudiées, seule la structure cristallographique de YcbB a été résolue à ce jour (Caveney *et al.*, 2019). Cette dernière se distingue des autres par sa taille, environ deux fois plus importante, et par sa composition en domaines. Ldt_{pae1} est plus petite mais se compose de deux domaines YkuD, le premier comprenant le motif catalytique conservé (SHGCIR) et le deuxième ne possédant pas le résidu cystéine catalytique (QLGKIR). Cette caractéristique n'est retrouvée chez aucune autre des neuf LDT étudiées et pourrait être le résultat d'une duplication. Les essais d'alignement des structures de YcbB, YnhG et Ldt_{pae1} ne sont pas concluants. Les structures de YbiS, ErfK, YcfS et Ldt_{pae2} se superposent quant à elles très bien, avec des compositions en domaines très similaires. À noter que la structure de YnhG semble beaucoup plus proche de ce groupe de LDT malgré des fonctions catalytiques différentes, sa composition en domaines étant très similaire à celle de Ldt_{pae2}. YafK et Ldt_{pae3} sont deux enzymes de plus petite taille. Le domaine YkuD constitue la quasi-totalité la séquence de Ldt_{pae3}. Ce domaine se superpose très facilement à celui de YafK.





Domaines YkuD									
	YcbB	YafK	Ldt _{Pae3}	Ldt _{Pae2}	ErfK	YbiS	YnhG	YcfS	Ldt _{Pae1}
YcbB	100,0	11,7	14,3	24,2	21,1	21,1	23,6	20,8	15,7
YafK	11,7	100,0	30,6	16,7	19,5	22,0	18,4	21,6	12,4
Ldt _{Pae3}	14,3	30,6	100,0	20,6	19,8	17,9	24,4	20,9	17,0
Ldt _{Pae2}	24,2	16,7	20,6	100,0	46,3	52,3	47,7	48,5	29,0
ErfK	21,1	19,5	19,8	46,3	100,0	74,8	53,8	62,7	23,9
YbiS	21,1	22,0	17,9	52,3	74,8	100,0	52,7	63,4	26,1
YnhG	23,6	18,4	24,4	47,7	53,8	52,7	100,0	61,0	25,3
YcfS	20,8	21,6	20,9	48,5	62,7	63,4	61,0	100,0	30,1
Ldt _{Pae1}	15,7	12,4	17,0	29,0	23,9	26,1	25,3	30,1	100,0

Protéines entières									
	YcbB	Ldt _{Pae1}	Ldt _{Pae2}	ErfK	YbiS	YnhG	YcfS	YafK	Ldt _{Pae3}
YcbB	100,0	17,7	18,1	19,2	18,1	21,2	19,5	16,1	19,5
Ldt _{Pae1}	17,7	100,0	23,6	25,2	21,4	22,1	24,0	16,1	20,2
Ldt _{Pae2}	18,1	23,6	100,0	35,4	40,0	33,9	37,5	17,3	21,8
ErfK	19,2	25,2	35,4	100,0	63,0	45,4	46,6	22,2	21,0
YbiS	18,1	21,4	40,0	63,0	100,0	45,3	50,2	20,2	18,2
YnhG	21,2	22,1	33,9	45,4	45,3	100,0	49,0	17,8	24,5
YcfS	19,5	24,0	37,5	46,6	50,2	49,0	100,0	20,1	23,8
YafK	16,1	16,1	17,3	22,2	20,2	17,8	20,1	100,0	29,9
Ldt _{Pae3}	19,5	20,2	21,8	21,0	18,2	24,5	23,8	29,9	100,0

Figure 18. Environnement des gènes, prédictions de structure et pourcentages d'identité des LDT de *E. coli* et *P. aeruginosa*.

(A) Environnement des gènes codant pour les trois LDT de *P. aeruginosa* (à gauche, informations trouvées sur le site de la [Pseudomonas Genome DataBase](#)) et pour les six LDT de *E. coli* (à droite, informations trouvées sur le site [EcoCyc](#)). La fonction des protéines codées par chacun des gènes est renseignée lorsqu'elle est connue. (B) Groupe des LDT catalysant la formation de ponts de type 3→3 : structure de YcbB (PDB 6NTW) et prédiction des structures de YnhG et Ldt_{Pae1} réalisée par AlphaFold. Composition en domaines des trois LDT. (C) Groupe des LDT catalysant l'ancrage de la lipoprotéine de Braun au peptidoglycane : prédiction des structures de YbiS, ErfK, YcfS et Ldt_{Pae2} réalisée par AlphaFold. Composition en domaines des quatre LDT (D) Prédiction des structures de YafK et de Ldt_{Pae3} réalisée par AlphaFold. Composition en domaine des deux LDT. Le code couleur des structures est le même que celui des schémas représentant la composition des LDT en domaines. La cystéine catalytique, plus ou moins visible selon l'orientation, est colorée en rouge. (E) Pourcentages d'identité des domaines catalytiques YkuD des LDT (en haut) et des LDT entières (en bas) de *E. coli* et *P. aeruginosa* déduits d'alignements multiples réalisés sur Clustal Omega. En vert : LDT catalysant la formation de ponts de type 3→3 ; en orange : LDT catalysant l'ancrage de la lipoprotéine de Braun ; en violet : LDT hydrolysant la liaison entre la Lpp et le PG ; en noir : aucune preuve expérimentale disponible.

2. Les multiples facettes de YafK

En 2001, un premier article avait établi le tout premier lien (et le seul jusqu'à maintenant) entre une LDT et la formation de biofilms chez une souche entéro-agrégative de *E. coli* (EAEC) (Sheikh *et al.*, 2001). Cette étude repose sur une bibliothèque de mutants obtenus par insertion aléatoire de transposons, et avait permis de montrer que YafK était nécessaire à la formation de biofilms par la souche EAEC. YafK agirait sur le niveau de transcription de gènes codant pour les fimbriae de type II dont la présence est requise pour l'adhésion de la souche pathogène à la muqueuse intestinale. Le rôle de YafK pourrait aussi avoir des implications plus ou moins directes en lien avec le maintien de l'équilibre du degré de

liaison entre le peptidoglycane et la membrane externe. On pourrait par exemple émettre l'hypothèse que la libération de vésicules de la membrane externe (OMVs pour « *Outer Membrane Vesicles* ») soit empêchée par une enveloppe trop rigide, freinant ainsi les interactions entre les bactéries et avec l'hôte. En revanche, l'absence de YafK ne semble pas avoir d'impact sur le relargage de contenu périplasmique comme le montrent nos résultats de Western blot non publiés dans le deuxième article.

Par ailleurs, Winkle *et al* précisent dans leur étude que des homologues de YafK sont présents dans de nombreuses espèces bactériennes qui ne contiennent pas de Lpp, ce qui suggère l'existence chez ces bactéries de substrats différents de Lpp (Winkle et al., 2021). L'existence de telles protéines chez *E. coli* n'a pas été formellement éliminée, en effet Lpp est une protéine très abondante (10^6 copies par cellule) et les méthodes d'analyses utilisées en routine ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter des protéines 100 fois moins abondantes.

3. Exploration du rôle des LDT chez *Escherichia coli*

a) Stimulation de l'immunité innée

Le peptidoglycane est un puissant effecteur biologique. Les mucopeptides libérés lors du turnover peuvent entraîner une réponse inflammatoire de l'hôte et sont impliqués dans des voies spécifiques comme l'activation de macrophages, du complément, la production de monoxyde d'azote, d'anticorps, de cytokines ou de peptides antimicrobiens [pour une revue sur la reconnaissance du peptidoglycane par le système immunitaire inné, voir (Wolf and Underhill, 2018)]. En 2003, les récepteurs de l'immunité innée contenant un « *Nucleotide-binding Oligomerisation Domain* » (domaine NOD), appelés NOD1 et NOD2 ont été identifiés comme senseurs de constituants du peptidoglycane de la paroi bactérienne (Chamaillard *et al.*, 2003; Girardin, 2003; Girardin *et al.*, 2003a, 2003b; Inohara *et al.*, 2003). NOD1 reconnaît un dipeptide composé des résidus D-Glu et DAP (iE-DAP), en particulier présent chez les bactéries à Gram négatif. En effet, chez les bactéries à Gram positif, le DAP est généralement remplacé par une L-Lys, et les résidus D-Glu et DAP sont souvent amidés. NOD2 est un senseur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif puisqu'il reconnaît le muramyl-dipeptide (MDP), qui correspond au dipeptide L-Ala-D-Glu lié à un résidu MurNAc et constitue une structure minimale commune à la quasi-totalité des chimiotypes de peptidoglycane.

La reconnaissance des mucopeptides par les NOD ne dépend a priori pas du mode de réticulation du peptidoglycane. En effet, la synthèse des ponts de types 4→3 et 3→3 du peptidoglycane n'implique pas de tiges peptidiques de composition particulières. En revanche, les deux types de ponts sont clivés par des sous-ensembles distincts d'endopeptidases (Chodiseti and Reddy, 2019; Voedts *et al.*, 2021). Nous avons donc cherché à déterminer si un enrichissement en ponts de type 3→3 pouvait moduler la quantité d'agonistes NOD libérés dans le milieu de culture. Dans ce but, la souche de *E. coli* sauvage BW25113 et un dérivé déficient dans la formation de ces ponts (*ΔycbB ΔynhG*, appelé Δ2) ont été cultivés en

milieu riche (LB) dans trois conditions de croissance (phase exponentielle, phase stationnaire et biofilm). Les surnageants de ces cultures ont été testés dans l'équipe de Ivo Boneca à l'Institut Pasteur pour l'activation de la voie NOD. Cette équipe avait précédemment montré que *E. coli* cultivée en milieu minimum ne relarguait pas de fragments de peptidoglycane. Le choix d'un milieu riche s'est donc imposé pour la suite de ces expériences. Ce changement de milieu nous a conduit à réévaluer la structure du peptidoglycane. En comparaison au milieu minimum, la croissance en milieu riche est associée à une proportion de ponts de type 3→3 moins importante dans les trois conditions de culture. La proportion de ces ponts est toutefois augmentée en phase stationnaire et en biofilm. Les surnageants obtenus en milieu riche ont donc pu être utilisés pour étudier l'impact d'un enrichissement en ponts de type 3→3 sur la réponse NOD. Les résultats n'ont pas montré de variations dans le relargage d'agonistes NOD1 et NOD2 dans les surnageants de culture de BW25113 WT, Δ2 (déficiente dans la formation de ponts de type 3→3) et Δ3 (qui n'ancre plus la lipoprotéine de Braun au peptidoglycane) pour les trois conditions de culture.

b) Stabilité de l'enveloppe

YbiS, ErfK et YcfS ancrent la lipoprotéine de Braun au peptidoglycane, ce qui participe à la stabilité de l'enveloppe. L'inactivation de ces trois LDT chez le mutant Δ3 compromet la survie de la souche en présence d'EDTA. L'activité bactéricide de l'EDTA est cependant très variable en fonction du protocole expérimental. Les résultats sont reproductibles lorsque les bactéries sont remises en suspension dans un tampon Tris avant l'ajout de l'EDTA. Cette procédure conduit à une diminution du nombre de bactéries survivantes d'un facteur au moins égal à 10 000 en 4 heures en présence d'EDTA alors que la viabilité est très peu affectée en absence de ce composé. En revanche, lorsque l'EDTA est ajouté directement dans le milieu de culture, les résultats sont qualitativement mais pas quantitativement reproductibles. En effet, la viabilité des souches Δ3, Δ*lpp* et Δ6 est compromise mais la diminution du nombre de bactéries est très variable (de 1/10 à 1/1000). Les effets de l'EDTA sont donc très perturbés par le milieu, ce qui pourrait être dû à des variations de concentrations en cations dans le milieu LB utilisé entre les différentes manipulations. Alternativement, les cellules bactériennes pourraient conserver un métabolisme minimum en milieu riche mais pas en tampon Tris, ce qui pourrait leur permettre de mieux résister à l'activité bactéricide de l'EDTA. Pour l'ensemble des phénotypes étudiés, composition du peptidoglycane, effet bactéricide de l'EDTA, relargage du contenu périplasmique, nous n'avons observé aucune différence entre les souches Δ3 et Δ*lpp*. L'absence de l'ancrage de la lipoprotéine de Braun récapitule donc l'absence de cette protéine. Le rôle spécifique de la lipoprotéine libre, s'il existe, n'a pas été révélé par notre étude.

La délétion des trois LDT qui ancrent la lipoprotéine de Braun ainsi que la perte de cette lipoprotéine a conduit à une fuite du contenu périplasmique mise en évidence par une analyse SDS-PAGE des

surnageants de culture. Une analyse par Western blot nous a permis de conclure que la présence de ces protéines dans les surnageants n'était pas due à une lyse bactérienne mais bien à un relargage du contenu périplasmique. En effet, la protéine de liaison au maltose (MBP) périplasmique est détectée dans les surnageants de culture des souches $\Delta 3$, Δlpp et $\Delta 6$, mais la sous-unité cytoplasmique α de l'ARN polymérase (RNAP) ne l'est pas. Aucune fuite du contenu périplasmique n'a été observée chez les souches WT et $\Delta 2$. La formation d'OMVs par bourgeonnement de la membrane externe pourrait rendre compte de ces résultats et avait déjà été décrite chez des mutants de *E. coli* sans Lpp ou présentant un défaut de son ancrage (Schwechheimer *et al.*, 2014). Une hypervésiculation a également été observée chez des mutants de *P. aeruginosa* $\Delta oprL$ et $\Delta oprI$ (homologues de Pal et Lpp, respectivement) (Wessel *et al.*, 2013). Un protocole d'extraction des OMVs est en cours de mise au point au laboratoire et pourrait permettre de confirmer leur rôle et de mieux caractériser leur contenu.

Schwechheimer *et al.* avait également mis en évidence une production d'OMVs moindre chez le mutant de *E. coli* $\Delta 2$, couplée à une augmentation de l'ancrage de la lipoprotéine de Braun. La formation de ponts de type 3→3 et l'ancrage de la lipoprotéine de Braun au peptidoglycane semblent fonctionner selon un modèle de « vases communicants », la proportion de ponts de type 3→3 augmente lorsqu'il n'y plus d'ancrage de la Lpp et vice versa. Plusieurs études évoquent ce phénomène, que nous avons également pu observer lors de nos analyses du peptidoglycane des mutants $\Delta 2$ et $\Delta 3$ (Schwechheimer *et al.*, 2014; Winkle *et al.*, 2021). Il pourrait être dû au fait que les LDT sont en compétition pour une quantité limitante de térapeptide agissant comme donneur d'acyl dans la réaction de transpeptidation conduisant à l'ancrage de lipoprotéine ou la formation de ponts de type 3→3.

c) Perspectives

Évaluation du fitness cost associé à la perte des LDT

Chez nos deux modèles bactériens étudiés, les LDT ne sont pas essentielles pour la croissance planctonique en laboratoire ou pour la formation de biofilms. La question se pose cependant de savoir si la perte des LDT constitue un désavantage sélectif dans différentes conditions de croissance. Pour apporter des éléments de réponse, nous avons introduit des étiquettes (« tags ») contenant des gènes conférant une résistance au chloramphénicol (Cm^R) ou à la kanamycine (Km^R) dans le chromosome des souches BW25113 WT, $\Delta 2$ et $\Delta 3$ afin de suivre leur croissance en compétition dans des co-cultures. Pour éliminer tout facteur confondant dû à la présence des cassettes de résistance, nous échangerons systématiquement les paires de tags lors de nos analyses (*i.e.* WT Cm^R versus $\Delta 2$ Km^R et WT Km^R versus $\Delta 2$ Cm^R).

Les paires de souches seront inoculées (rapport 1/1) à une dilution de 1/1000 dans un milieu liquide (LB) et cultivées sur la nuit à 37 °C. Le lendemain, elles seront à nouveau diluées au 1/1 000^{ème} et cultivées sur la nuit. Les bactéries seront dénombrées sur des géloses contenant du chloramphénicol ou

de la kanamycine après cinq cycles de dilution et de croissance jusqu'à saturation (24 heures par cycle). L'ensemble des souches portant les tags permettra aussi d'étudier la compétition lors d'une croissance en biofilm en plaque 96 puits. Par cette approche, nous pourrions également évaluer la survie des formes planctoniques en phase stationnaire à l'échelle de plusieurs semaines. Des co-cultures des formes planctoniques en chemostat pourraient également être réalisées pour évaluer l'impact des délétions sur la croissance exponentielle en continu.

Ciblage des LDT dans de nouvelles stratégies anti-biofilms

Une étude clinique est en cours à l'Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP, Paris) pour l'utilisation d'une association gentamicine-EDTA chez des patients souffrant d'une infection liée à la formation de biofilm sur un cathéter de longue durée (CATH-GE, [informations disponibles en ligne](#)). Les 35 patients inclus reçoivent pendant 10 jours le traitement gentamicine-EDTA localement, à l'intérieur du cathéter, associé à des antibiotiques en perfusion puis par voie orale. Une surveillance étroite permet d'évaluer la tolérance et de mesurer la fréquence de guérison après la fin du traitement. L'efficacité de cette association sur plusieurs bactéries à Gram positif (*e.g. S. aureus* et *E. faecalis*) et négatif (*e.g. E. coli* et *P. aeruginosa*) avait été démontrée *in vitro* et chez des rats immunocompétents et immunodéprimés (Chauhan *et al.*, 2012; Lebeaux *et al.*, 2015). Nos résultats ont permis de montrer que l'ancrage de la lipoprotéine de Braun au peptidoglycane était essentiel pour empêcher la déstabilisation de l'enveloppe en présence d'EDTA chez *E. coli* et chez *P. aeruginosa*. Cet ancrage est assuré par les trois LDT ErfK, YbiS et YcfS chez *E. coli* et par Ldt_{Pa2} chez *P. aeruginosa*. L'idée serait donc de cibler ces LDT afin de potentialiser les effets déstabilisateurs de l'EDTA. Sachant que les LDT ne sont efficacement inhibées que par les carbapénèmes, il est tentant de proposer une étude sur une association carbapénème-EDTA. Cependant, cette classe de β -lactamines agit aussi sur les PLP et il n'existe à ce jour aucun antibiotique ciblant spécifiquement les LDT.

RÉFÉRENCES

- Aliashkevich, A., Cava, F., 2022. LD-transpeptidases: the great unknown among the peptidoglycan cross-linkers. *The FEBS Journal* 289, 4718–4730. <https://doi.org/10.1111/febs.16066>
- Ambler, R., 1980. The structure of β -lactamases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 289, 321–331. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
- Anderl, J.N., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2000. Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1818–1824. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1818-1824.2000>
- Antonoplis, A., Zang, X., Huttner, M.A., Chong, K.K.L., Lee, Y.B., Co, J.Y., Amieva, M.R., Kline, K.A., Wender, P.A., Cegelski, L., 2018. A Dual-Function Antibiotic-Transporter Conjugate Exhibits Superior Activity in Sterilizing MRSA Biofilms and Killing Persister Cells. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 16140–16151. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b08711>
- Arthur, M., Depardieu, F., Reynolds, P., Courvalin, P., 1999. Moderate-Level Resistance to Glycopeptide LY333328 Mediated by Genes of the *vanA* and *vanB* Clusters in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1875–1880. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.8.1875>
- Ashby, M.J., Neale, J.E., Knott, S.J., Critchley, I.A., 1994. Effect of antibiotics on non-growing planktonic cells and biofilms of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 33, 443–452. <https://doi.org/10.1093/jac/33.3.443>
- Asmar, A.T., Ferreira, J.L., Cohen, E.J., Cho, S.-H., Beeby, M., Hughes, K.T., Collet, J.-F., 2017. Communication across the bacterial cell envelope depends on the size of the periplasm. *PLoS Biol* 15, e2004303. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004303>
- Atze, H., Liang, Y., Hugonnet, J.-E., Gutierrez, A., Rusconi, F., Arthur, M., 2022. Heavy isotope labeling and mass spectrometry reveal unexpected remodeling of bacterial cell wall expansion in response to drugs. *eLife* 11, e72863. <https://doi.org/10.7554/eLife.72863>
- Aumeran, C., Balestrino, D., Forestier, C., 2020. Biofilms bactériens et santé. *Encyclopédie de l'environnement*.
- Bahadur, R., Chodiseti, P.K., Reddy, M., 2021. 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, e2101989118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2101989118>
- Baranowski, C., Welsh, M.A., Sham, L.-T., Eskandarian, H.A., Lim, H.C., Kieser, K.J., Wagner, J.C., McKinney, J.D., Fantner, G.E., Ioerger, T.R., Walker, S., Bernhardt, T.G., Rubin, E.J., Rego, E.H., 2018. Maturing *Mycobacterium smegmatis* peptidoglycan requires non-canonical crosslinks to maintain shape. *eLife* 7, e37516. <https://doi.org/10.7554/eLife.37516>

- Barraud, N., Kelso, M., Rice, S., Kjelleberg, S., 2014. Nitric Oxide: A Key Mediator of Biofilm Dispersal with Applications in Infectious Diseases. *CPD* 21, 31–42. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140905112822>
- Barreteau, H., Kovač, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., Blanot, D., 2008. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32, 168–207. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00104.x>
- Battesti, A., Majdalani, N., Gottesman, S., 2011. The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 189–213. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102946>
- Baudoux, P., Bles, N., Lemaire, S., Mingeot-Leclercq, M.-P., Tulkens, P.M., Van Bambeke, F., 2006. Combined effect of pH and concentration on the activities of gentamicin and oxacillin against *Staphylococcus aureus* in pharmacodynamic models of extracellular and intracellular infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59, 246–253. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl489>
- Bellido, F., Veuthey, C., Blaser, J., Banernfeind, A., Pechère, J.C., 1990. Novel resistance to imipenem associated with an altered PBP-4 in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother* 25, 57–68. <https://doi.org/10.1093/jac/25.1.57>
- Beloin, C., Da Re, S., Ghigo, J.-M., 2005. Colonization of Abiotic Surfaces. *EcoSal Plus* 1, ecosalplus.8.3.1.3. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.8.3.1.3>
- Bernier, S.P., Lebeaux, D., DeFrancesco, A.S., Valomon, A., Soubigou, G., Coppée, J.-Y., Ghigo, J.-M., Beloin, C., 2013. Starvation, Together with the SOS Response, Mediates High Biofilm-Specific Tolerance to the Fluoroquinolone Ofloxacin. *PLoS Genet* 9, e1003144. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003144>
- Biarrotte-Sorin, S., Hugonnet, J.-E., Delfosse, V., Mainardi, J.-L., Gutmann, L., Arthur, M., Mayer, C., 2006. Crystal Structure of a Novel β -Lactam-insensitive Peptidoglycan Transpeptidase. *Journal of Molecular Biology* 359, 533–538. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.014>
- Bielnicki, J., Devedjiev, Y., Derewenda, U., Dauter, Z., Joachimiak, A., Derewenda, Z.S., 2005. 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, 144–151. <https://doi.org/10.1002/prot.20702>
- Bigger, Joseph W., 1944. TREATMENT OF STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS WITH PENICILLIN BY INTERMITTENT STERILISATION. *The Lancet* 244, 497–500. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3)

- Binte Muhammad Jai, H.S., Dam, L.C., Tay, L.S., Koh, J.J.W., Loo, H.L., Kline, K.A., Goh, B.C., 2020. Engineered Lysins With Customized Lytic Activities Against Enterococci and Staphylococci. *Front. Microbiol.* 11, 574739. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.574739>
- Blasco, B., Pisabarro, A.G., de Pedro, M.A., 1988. Peptidoglycan biosynthesis in stationary-phase cells of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170, 5224–5228. <https://doi.org/10.1128/jb.170.11.5224-5228.1988>
- Böth, D., Steiner, E.M., Stadler, D., Lindqvist, Y., Schnell, R., Schneider, G., 2013. Structure of Ldt_{Mt2}, an L, D-transpeptidase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 69, 432–441. <https://doi.org/10.1107/S0907444912049268>
- Braun, V., Hantke, K., 2019. Lipoproteins: Structure, Function, Biosynthesis, in: Kuhn, A. (Ed.), *Bacterial Cell Walls and Membranes, Subcellular Biochemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 39–77. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_3
- Braun, V., Wolff, H., 1970. The Murein-Lipoprotein Linkage in the Cell Wall of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 14, 387–391. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1970.tb00301.x>
- Brennan, P.J., Nikaido, H., 1995. THE ENVELOPE OF MYCOBACTERIA. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 29–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000333>
- Brenner, K., Arnold, F.H., 2011. Self-Organization, Layered Structure, and Aggregation Enhance Persistence of a Synthetic Biofilm Consortium. *PLoS ONE* 6, e16791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016791>
- Brives, C., Pourraz, J., 2020. Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures. *Palgrave Commun* 6, 100. <https://doi.org/10.1057/s41599-020-0478-4>
- Brooun, A., Liu, S., Lewis, K., 2000. A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 640–646. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.640-646.2000>
- Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R., Casadevall, A., 2015. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 13, 620–630. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>
- Burmølle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T., Sørensen, S.J., 2014. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends in Microbiology* 22, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.004>
- Bush, K., Bradford, P.A., 2016. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>

- Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., 1995. A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure 39.
- Cameron, T.A., Anderson-Furgeson, J., Zupan, J.R., Zik, J.J., Zambryski, P.C., 2014. Peptidoglycan Synthesis Machinery in *Agrobacterium tumefaciens* During Unipolar Growth and Cell Division. *mBio* 5, e01219-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01219-14>
- Cava, F., de Pedro, M.A., Lam, H., Davis, B.M., Waldor, M.K., 2011. Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D -amino acids: Distinct pathways for cell wall remodelling. *The EMBO Journal* 30, 3442–3453. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.246>
- Caveney, N.A., Caballero, G., Voedts, H., Niciforovic, A., Worrall, L.J., Vuckovic, M., Fonvielle, M., Hugonnet, J.-E., Arthur, M., Strynadka, N.C.J., 2019. Structural insight into YcbB-mediated beta-lactam resistance in *Escherichia coli*. *Nat Commun* 10, 1849. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09507-0>
- Caveney, N.A., Workman, S.D., Yan, R., Atkinson, C.E., Yu, Z., Strynadka, N.C.J., 2021. CryoEM structure of the antibacterial target PBP1b at 3.3 Å resolution. *Nat Commun* 12, 2775. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23063-6>
- Chai, G., Park, H., Yu, S., Zhou, F., Li, J., Xu, Q., Zhou, Q. (Tony), 2019. Evaluation of co-delivery of colistin and ciprofloxacin in liposomes using an in vitro human lung epithelial cell model. *International Journal of Pharmaceutics* 569, 118616. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118616>
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M.A., Foster, S.J., Mak, T.W., Nuñez, G., Inohara, N., 2003. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 4, 702–707. <https://doi.org/10.1038/ni945>
- Chauhan, A., Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., Beloin, C., 2012. Full and Broad-Spectrum *In Vivo* Eradication of Catheter-Associated Biofilms Using Gentamicin-EDTA Antibiotic Lock Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 6310–6318. <https://doi.org/10.1128/AAC.01606-12>
- Chen, L., Suh, B.I., Yang, J., 2018. Antibacterial dental restorative materials: A review. *Am J Dent* 31, 6B-12B.
- Cho, H., Uehara, T., Bernhardt, T.G., 2014. Beta-Lactam Antibiotics Induce a Lethal Malfunctioning of the Bacterial Cell Wall Synthesis Machinery. *Cell* 159, 1300–1311. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.017>

- Chodiseti, P.K., Reddy, M., 2019. Peptidoglycan hydrolase of an unusual cross-link cleavage specificity contributes to bacterial cell wall synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 7825–7830. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816893116>
- Choi, Y.C., Morgenroth, E., 2003. Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. *Water Sci Technol* 47, 69–76.
- Christensen, G.D., Baddour, L.M., Simpson, W.A., 1987. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production in vitro and in vivo. *Infect Immun* 55, 2870–2877. <https://doi.org/10.1128/iai.55.12.2870-2877.1987>
- Chung, P.Y., Khanum, R., 2017. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 50, 405–410. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005>
- Cipolla, D., Blanchard, J., Gonda, I., 2016. Development of Liposomal Ciprofloxacin to Treat Lung Infections. *Pharmaceutics* 8, 6. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8010006>
- Cirioni, O., Giacometti, A., Ghiselli, R., Bergnach, C., Orlando, F., Mocchegiani, F., Silvestri, C., Licci, A., Skerlavaj, B., Zanetti, M., Saba, V., Scalise, G., 2006. Pre-treatment of central venous catheters with the cathelicidin BMAP-28 enhances the efficacy of antistaphylococcal agents in the treatment of experimental catheter-related infection. *Peptides* 27, 2104–2110. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.03.007>
- Clancy, J.P., Dupont, L., Konstan, M.W., Billings, J., Fustik, S., Goss, C.H., Lymp, J., Minic, P., Quittner, A.L., Rubenstein, R.C., Young, K.R., Saiman, L., Burns, J.L., Govan, J.R.W., Ramsey, B., Gupta, R., for the Arikace Study Group, 2013. Phase II studies of nebulised Arikace in CF patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Thorax* 68, 818–825. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-202230>
- Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., Borlee, B.R., Wozniak, D.J., Wong, G.C.L., Parsek, M.R., 2011. The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 7, e1001264. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001264>
- Correale, S., Ruggiero, A., Capparelli, R., Pedone, E., Berisio, R., 2013. Structures of free and inhibited forms of the L, D-transpeptidase Ldt_{M11} from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 69, 1697–1706. <https://doi.org/10.1107/S0907444913013085>
- Costa, K., Bacher, G., Allmaier, G., Dominguez-Bello, M.G., Engstrand, L., Falk, P., de Pedro, M.A., García-del Portillo, F., 1999. The Morphological Transition of *Helicobacter pylori* Cells from

- Spiral to Coccoid Is Preceded by a Substantial Modification of the Cell Wall. *J Bacteriol* 181, 3710–3715. <https://doi.org/10.1128/JB.181.12.3710-3715.1999>
- Costerton, J.W., Irvin, R.T., Cheng, K.-J., Sutherland, I.W., 1981. The Role of Bacterial Surface Structures in Pathogenesis. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 8, 303–338. <https://doi.org/10.3109/10408418109085082>
- Curtis, N.A., Orr, D., Ross, G.W., Boulton, M.G., 1979. 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. <https://doi.org/10.1128/AAC.16.5.533>
- da Silva, R.A.G., Afonina, I., Kline, K.A., 2021. Eradicating biofilm infections: an update on current and prospective approaches. *Current Opinion in Microbiology* 63, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.07.001>
- Dai, Y., Pinedo, V., Tang, A.Y., Cava, F., Geisinger, E., 2021. A New Class of Cell Wall-Recycling L,D-Carboxypeptidase Determines b-Lactam Susceptibility and Morphogenesis in 12, 19.
- Danese, P.N., Pratt, L.A., Kolter, R., 2000. Exopolysaccharide Production Is Required for Development of *Escherichia coli* K-12 Biofilm Architecture. *J Bacteriol* 182, 3593–3596. <https://doi.org/10.1128/JB.182.12.3593-3596.2000>
- Darby, E.M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M.S., Alav, I., Webber, M.A., Blair, J.M.A., 2022. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat Rev Microbiol*. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
- Davies, D., 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2, 114–122. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
- Davies, D.G., Marques, C.N.H., 2009. A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. *J Bacteriol* 191, 1393–1403. <https://doi.org/10.1128/JB.01214-08>
- D’Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W.L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N., Wright, G.D., 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477, 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
- D’Costa, V.M., Mukhtar, T.A., Patel, T., Koteva, K., Waglechner, N., Hughes, D.W., Wright, G.D., De Pascale, G., 2012. Inactivation of the Lipopeptide Antibiotic Daptomycin by Hydrolytic Mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 757–764. <https://doi.org/10.1128/AAC.05441-11>
- De Beer, D., Srinivasan, R., Stewart, P.S., 1994. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 60, 4339–4344. <https://doi.org/10.1128/aem.60.12.4339-4344.1994>

- de Beer, D., Stoodley, P., Lewandowski, Z., 1997. Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. *Biotechnol. Bioeng.* 53, 151–158. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970120\)53:2<151::AID-BIT4>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970120)53:2<151::AID-BIT4>3.0.CO;2-N)
- de Beer, D., Stoodley, P., Roe, F., Lewandowski, Z., 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 1131–1138. <https://doi.org/10.1002/bit.260431118>
- Dekker, A.P., Uzoho, C., Scammell, B., 2019. Do Antibiotic-impregnated Calcium Sulfate Beads Improve the Healing of Neuropathic Foot Ulcers With Osteomyelitis Undergoing Surgical Debridement? *Wounds* 31, 145–150.
- Delhaye, A., Collet, J.-F., Laloux, G., 2016. Fine-Tuning of the Cpx Envelope Stress Response Is Required for Cell Wall Homeostasis in *Escherichia coli*. *mBio* 7, e00047-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00047-16>
- Delhaye, A., Laloux, G., Collet, J.-F., 2019. The Lipoprotein NlpE Is a Cpx Sensor That Serves as a Sentinel for Protein Sorting and Folding Defects in the *Escherichia coli* Envelope. *J Bacteriol* 201. <https://doi.org/10.1128/JB.00611-18>
- Diacon, A.H., van der Merwe, L., Barnard, M., von Groote-Bidlingmaier, F., Lange, C., García-Basteiro, A.L., Sevene, E., Ballell, L., Barros-Aguirre, D., 2016. β -Lactams against Tuberculosis — New Trick for an Old Dog? *N Engl J Med* 375, 393–394. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1513236>
- Domanski, P.J., Patel, P.R., Bayer, A.S., Zhang, L., Hall, A.E., Syribeys, P.J., Gorovits, E.L., Bryant, D., Vernachio, J.H., Hutchins, J.T., Patti, J.M., 2005. Characterization of a Humanized Monoclonal Antibody Recognizing Clumping Factor A Expressed by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 73, 5229–5232. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.5229-5232.2005>
- Dramsi, S., Magnet, S., Davison, S., Arthur, M., 2008. Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *FEMS Microbiol Rev* 32, 307–320. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00102.x>
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H.W., Pos, K.M., Piddock, L.J.V., Luisi, B.F., 2018. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat Rev Microbiol* 16, 523–539. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>
- Eckert, R., Brady, K.M., Greenberg, E.P., Qi, F., Yarbrough, D.K., He, J., McHardy, I., Anderson, M.H., Shi, W., 2006. Enhancement of Antimicrobial Activity against *Pseudomonas aeruginosa* by Coadministration of G10KHc and Tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3833–3838. <https://doi.org/10.1128/AAC.00509-06>
- Edoo, Z., Iannazzo, L., Compain, F., Li de la Sierra Gallay, I., van Tilbeurgh, H., Fonvielle, M., Bouchet, F., Le Run, E., Mainardi, J.-L., Arthur, M., Ethève-Quellejeu, M., Hugonnet, J.-E.,

2018. Synthesis of Avibactam Derivatives and Activity on β -Lactamases and Peptidoglycan Biosynthesis Enzymes of Mycobacteria. *Chem. Eur. J.* 24, 8081–8086. <https://doi.org/10.1002/chem.201800923>
- Ehmann, D.E., Jahić, H., Ross, P.L., Gu, R.-F., Hu, J., Kern, G., Walkup, G.K., Fisher, S.L., 2012. Avibactam is a covalent, reversible, non- β -lactam β -lactamase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 11663–11668. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205073109>
- Eren, E., Vijayaraghavan, J., Liu, J., Cheneke, B.R., Touw, D.S., Lepore, B.W., Indic, M., Movileanu, L., van den Berg, B., 2012. Substrate Specificity within a Family of Outer Membrane Carboxylate Channels. *PLoS Biol* 10, e1001242. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001242>
- Farra, A., Islam, S., Strålfors, A., Sörberg, M., Wretling, B., 2008. Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. *International Journal of Antimicrobial Agents* 31, 427–433. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.12.016>
- Fazli, M., Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Jørgensen, B., Andersen, A.S., Krogfelt, K.A., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2009. Nonrandom Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in Chronic Wounds. *J Clin Microbiol* 47, 4084–4089. <https://doi.org/10.1128/JCM.01395-09>
- Fleming, D., Rumbaugh, K., 2017. Approaches to Dispersing Medical Biofilms. *Microorganisms* 5, 15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020015>
- Flemming, H.-C., Neu, T.R., Wozniak, D.J., 2007. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells.” *J Bacteriol* 189, 7945–7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Forsberg, K.J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E.M., Sommer, M.O.A., Dantas, G., 2012. The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. *Science* 337, 1107–1111. <https://doi.org/10.1126/science.1220761>
- Forti, F., Roach, D.R., Cafora, M., Pasini, M.E., Horner, D.S., Fiscarelli, E.V., Rossitto, M., Cariani, L., Briani, F., Debarbieux, L., Ghisotti, D., 2018. Design of a Broad-Range Bacteriophage Cocktail That Reduces *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms and Treats Acute Infections in Two Animal Models. *Antimicrob Agents Chemother* 62, e02573-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02573-17>
- Gao, L., Liu, Y., Kim, D., Li, Y., Hwang, G., Naha, P.C., Cormode, D.P., Koo, H., 2016. Nanocatalysts promote *Streptococcus mutans* biofilm matrix degradation and enhance bacterial killing to suppress dental caries in vivo. *Biomaterials* 101, 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.05.051>

- García-Heredia, A., Pohane, A.A., Melzer, E.S., Carr, C.R., Fiolek, T.J., Rundell, S.R., Lim, H.C., Wagner, J.C., Morita, Y.S., Swarts, B.M., Siegrist, M.S., 2018. Peptidoglycan precursor synthesis along the sidewall of pole-growing mycobacteria. *eLife* 7, e37243. <https://doi.org/10.7554/eLife.37243>
- Geiger, T., Pazos, M., Lara-Tejero, M., Vollmer, W., Galán, J.E., 2018. Peptidoglycan editing by a specific ld-transpeptidase controls the muramidase-dependent secretion of typhoid toxin. *Nat Microbiol* 3, 1243–1254. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0248-x>
- Girardin, S.E., 2003. Nod1 Detects a Unique Muropeptide from Gram-Negative Bacterial Peptidoglycan. *Science* 300, 1584–1587. <https://doi.org/10.1126/science.1084677>
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J., 2003a. Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection. *Journal of Biological Chemistry* 278, 8869–8872. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200651200>
- Girardin, S.E., Travassos, L.H., Hervé, M., Blanot, D., Boneca, I.G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J., Mengin-Lecreulx, D., 2003b. Peptidoglycan Molecular Requirements Allowing Detection by Nod1 and Nod2. *Journal of Biological Chemistry* 278, 41702–41708. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307198200>
- Glauner, B., Höltje, J.V., Schwarz, U., 1988. The composition of the murein of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 263, 10088–10095. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)81481-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)81481-3)
- Godessart, P., Lannoy, A., Dieu, M., Van der Verren, S.E., Soumillon, P., Collet, J.-F., Remaut, H., Renard, P., De Bolle, X., 2020. β -Barrels covalently link peptidoglycan and the outer membrane in the α -proteobacterium *Brucella abortus*. *Nat Microbiol* 6, 27–33. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00799-3>
- Goffin, C., Ghuysen, J.-M., 1998. Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic Family of Orthologs and Paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1079–1093. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.4.1079-1093.1998>
- Goltermann, L., Tolker-Nielsen, T., 2017. Importance of the Exopolysaccharide Matrix in Antimicrobial Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Aggregates. *Antimicrob Agents Chemother* 61, e02696-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02696-16>
- Goodell, E.W., 1985. Recycling of murein by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 163, 305–310. <https://doi.org/10.1128/JB.163.1.305-310.1985>
- Goodell, E.W., Schwarz, U., 1985. Release of cell wall peptides into culture medium by exponentially growing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 162, 391–397. <https://doi.org/10.1128/JB.162.1.391-397.1985>

- Gu, H., Hou, S., Yongyat, C., De Tore, S., Ren, D., 2013. Patterned Biofilm Formation Reveals a Mechanism for Structural Heterogeneity in Bacterial Biofilms. *Langmuir* 29, 11145–11153. <https://doi.org/10.1021/la402608z>
- Gupta, A., Mumtaz, S., Li, C.-H., Hussain, I., Rotello, V.M., 2019. Combatting antibiotic-resistant bacteria using nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* 48, 415–427. <https://doi.org/10.1039/C7CS00748E>
- Hakenbeck, R., Brückner, R., Denapate, D., Maurer, P., 2012. Molecular mechanisms of β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiology* 7, 395–410. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.2>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2, 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Hamburger, J.B., Hoertz, A.J., Lee, A., Senturia, R.J., McCafferty, D.G., Loll, P.J., 2009. A crystal structure of a dimer of the antibiotic ramoplanin illustrates membrane positioning and a potential Lipid II docking interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13759–13764. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904686106>
- Handfield, J., Gagnon, L., Dargis, M., Huletsky, A., 1997. Sequence of the ponA gene and characterization of the penicillin-binding protein 1A of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Gene* 199, 49–56. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00345-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00345-4)
- Hantke, K., Braun, V., 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, 284–296. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb02757.x>
- Heijenoort, J. v., 2001. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* 11, 25R–36R. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.3.25R>
- Henrichfreise, B., Brunke, M., Viollier, P.H., 2016. Bacterial Surfaces: The Wall that SEDS Built. *Current Biology* 26, R1158–R1160. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.028>
- Henrici, A.T., 1933. Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. *J Bacteriol* 25, 277–287. <https://doi.org/10.1128/jb.25.3.277-287.1933>
- Hetrick, E.M., Schoenfisch, M.H., 2006. Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chem. Soc. Rev.* 35, 780. <https://doi.org/10.1039/b515219b>
- Hoffman, L.R., D’Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A., Miller, S.I., 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 436, 1171–1175. <https://doi.org/10.1038/nature03912>

- Høiby, N., 2017. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS* 125, 272–275. <https://doi.org/10.1111/apm.12686>
- Høiby, N., Ciofu, O., Bjarnsholt, T., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiology* 5, 1663–1674. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.125>
- Höltje, J.-V., 1998. Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 181–203. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.1.181-203.1998>
- Honsa, E.S., Cooper, V.S., Mhaisien, M.N., Frank, M., Shaker, J., Iverson, A., Rubnitz, J., Hayden, R.T., Lee, R.E., Rock, C.O., Tuomanen, E.I., Wolf, J., Rosch, J.W., 2017. RelA Mutant *Enterococcus faecium* with Multiantibiotic Tolerance Arising in an Immunocompromised Host. *mBio* 8, e02124-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02124-16>
- Hsu, S.-T.D., Breukink, E., Tischenko, E., Lutters, M.A.G., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A.M.J.J., van Nuland, N.A.J., 2004. The nisin–lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat Struct Mol Biol* 11, 963–967. <https://doi.org/10.1038/nsmb830>
- Hughes, D., Andersson, D.I., 2012. Selection of resistance at lethal and non-lethal antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology* 15, 555–560. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.07.005>
- Hugonnet, J.-E., Mengin-Lecreulx, D., Monton, A., den Blaauwen, T., Carbonnelle, E., Veckerlé, C., Brun, Y., V., 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, e19469. <https://doi.org/10.7554/eLife.19469>
- Hugonnet, J.-E., Tremblay, L.W., Boshoff, H.I., Barry, C.E., Blanchard, J.S., 2009. Meropenem-Clavulanate Is Effective Against Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 323, 1215–1218. <https://doi.org/10.1126/science.1167498>
- Indiani, C., Sauve, K., Raz, A., Abdelhady, W., Xiong, Y.Q., Cassino, C., Bayer, A.S., Schuch, R., 2019. The Antistaphylococcal Lysin, CF-301, Activates Key Host Factors in Human Blood To Potentiate Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteriolysis. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e02291-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02291-18>
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S.J., Moran, A.P., Fernandez-Luna, J.L., Nuñez, G., 2003. Host Recognition of Bacterial Muramyl Dipeptide Mediated through NOD2. *Journal of Biological Chemistry* 278, 5509–5512. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200673200>

- Inoue, A., Murata, Y., Takahashi, H., Tsuji, N., Fujisaki, S., Kato, J., 2008. Involvement of an Essential Gene, *mviN*, in Murein Synthesis in *Escherichia coli*. *JB* 190, 7298–7301. <https://doi.org/10.1128/JB.00551-08>
- Jacobsen, S.M., Stickler, D.J., Mobley, H.L.T., Shirtliff, M.E., 2008. Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev* 21, 26–59. <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-07>
- Jardeleza, C., Thierry, B., Rao, S., Rajiv, S., Drilling, A., Miljkovic, D., Paramasivan, S., James, C., Dong, D., Thomas, N., Vreugde, S., Prestidge, C.A., Wormald, P.-J., 2015. An in vivo safety and efficacy demonstration of a topical liposomal nitric oxide donor treatment for *Staphylococcus aureus* biofilm-associated rhinosinusitis. *Translational Research* 166, 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.06.009>
- Jennings, L.K., Storek, K.M., Ledvina, H.E., Coulon, C., Marmont, L.S., Sadovskaya, I., Secor, P.R., Tseng, B.S., Scian, M., Filloux, A., Wozniak, D.J., Howell, P.L., Parsek, M.R., 2015. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 11353–11358. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503058112>
- Jo, H., Ban, C., 2016. Aptamer–nanoparticle complexes as powerful diagnostic and therapeutic tools. *Exp Mol Med* 48, e230–e230. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.44>
- Johnson, J.W., Fisher, J.F., Mobashery, S., 2013. Bacterial cell-wall recycling: Bacterial cell-wall recycling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1277, 54–75. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06813.x>
- Jørgensen, K.M., Wassermann, T., Jensen, P.Ø., Hengzuang, W., Molin, S., Høiby, N., Ciofu, O., 2013. Sublethal Ciprofloxacin Treatment Leads to Rapid Development of High-Level Ciprofloxacin Resistance during Long-Term Experimental Evolution of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 4215–4221. <https://doi.org/10.1128/AAC.00493-13>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

- Jurėnas, D., Fraikin, N., Goormaghtigh, F., Van Melderen, L., 2022. Biology and evolution of bacterial toxin–antitoxin systems. *Nat Rev Microbiol* 20, 335–350. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00661-1>
- Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W., Walsh, C., 2005. Glycopeptide and Lipoglycopeptide Antibiotics. *Chem. Rev.* 105, 425–448. <https://doi.org/10.1021/cr030103a>
- Kang, S., Jin, C., Kim, D., Park, S.J., Han, S., Lee, B., 2021. Structure-based design of peptides that trigger *Streptococcus pneumoniae* cell death. *FEBS J.* 288, 1546–1564. <https://doi.org/10.1111/febs.15514>
- Kang, S.-M., Kim, D.-H., Lee, K.-Y., Park, S.J., Yoon, H.-J., Lee, S.J., Im, H., Lee, B.-J., 2017. Functional details of the *Mycobacterium tuberculosis* VapBC26 toxin-antitoxin system based on a structural study: insights into unique binding and antibiotic peptides. *Nucleic Acids Research* 45, 8564–8580. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx489>
- Kang, S.-M., Moon, H., Han, S.-W., Kim, D.-H., Kim, B.M., Lee, B.-J., 2020. Structure-Based *De Novo* Design of *Mycobacterium Tuberculosis* VapC-Activating Stapled Peptides. *ACS Chem. Biol.* 15, 2493–2498. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00492>
- Kaspy, I., Rotem, E., Weiss, N., Ronin, I., Balaban, N.Q., Glaser, G., 2013. HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. *Nat Commun* 4, 3001. <https://doi.org/10.1038/ncomms4001>
- Khanmohammadi Chenab, K., Sohrabi, B., Rahmanzadeh, A., 2019. Superhydrophobicity: advanced biological and biomedical applications. *Biomater. Sci.* 7, 3110–3137. <https://doi.org/10.1039/C9BM00558G>
- Khansa, I., Schoenbrunner, A.R., Kraft, C.T., Janis, J.E., 2019. Silver in Wound Care—Friend or Foe?: A Comprehensive Review. *Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open* 7, e2390. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000002390>
- Kint, C.I., Verstraeten, N., Fauvart, M., Michiels, J., 2012. New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends in Microbiology* 20, 577–585. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.08.009>
- Klare, I., Rodloff, A.C., Wagner, J., Witte, W., Hakenbeck, R., 1992. Overproduction of a penicillin-binding protein is not the only mechanism of penicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 36, 783–787. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.4.783>
- Kocaoglu, O., Carlson, E.E., 2015. Profiling of β -Lactam Selectivity for Penicillin-Binding Proteins in *Escherichia coli* Strain DC2. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 2785–2790. <https://doi.org/10.1128/AAC.04552-14>

- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00739.x>
- Kuk, A.C.Y., Mashalidis, E.H., Lee, S.-Y., 2017. Crystal structure of the MOP flippase MurJ in an inward-facing conformation. *Nat Struct Mol Biol* 24, 171–176. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3346>
- Kumar, P., Arora, K., Lloyd, J.R., Lee, I.Y., Nair, V., Fischer, E., Boshoff, H.I.M., Barry, C.E., 2012. Meropenem inhibits D,D-carboxypeptidase activity in *Mycobacterium tuberculosis*: Peptidoglycan of *M. tuberculosis*. *Molecular Microbiology* 86, 367–381. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08199.x>
- Kvist, M., Hancock, V., Klemm, P., 2008. Inactivation of Efflux Pumps Abolishes Bacterial Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol* 74, 7376–7382. <https://doi.org/10.1128/AEM.01310-08>
- Labischinski, H., Naumann, D., Fischer, W., 1991. Small and medium-angle X-ray analysis of bacterial lipoteichoic acid phase structure. *Eur J Biochem* 202, 1269–1274. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16499.x>
- Lai, G.C., Cho, H., Bernhardt, T.G., 2017. The mecillinam resistome reveals a role for peptidoglycan endopeptidases in stimulating cell wall synthesis in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 13, e1006934. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006934>
- Lambert, P., 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 1471–1485. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.003>
- Landry, D.L., Braden, G.L., Gobeille, S.L., Haessler, S.D., Vaidya, C.K., Sweet, S.J., 2010. Emergence of Gentamicin-Resistant Bacteremia in Hemodialysis Patients Receiving Gentamicin Lock Catheter Prophylaxis. *CJASN* 5, 1799–1804. <https://doi.org/10.2215/CJN.01270210>
- Laverty, G., Gorman, S., Gilmore, B., 2014. Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. *Pathogens* 3, 596–632. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030596>
- Lavollay, M., Arthur, M., Fourgeaud, M., Dubost, L., Marie, A., Veziris, N., Blanot, D., Gutmann, L., Mainardi, J.-L., 2008. The Peptidoglycan of Stationary-Phase *Mycobacterium tuberculosis* Predominantly Contains Cross-Links Generated by L,D -Transpeptidation. *J Bacteriol* 190, 4360–4366. <https://doi.org/10.1128/JB.00239-08>
- Lavollay, M., Fourgeaud, M., Herrmann, J.-L., Dubost, L., Marie, A., Gutmann, L., Arthur, M., Mainardi, J.-L., 2011. The Peptidoglycan of *Mycobacterium abscessus* Is Predominantly Cross-Linked by L, D -Transpeptidases. *J Bacteriol* 193, 778–782. <https://doi.org/10.1128/JB.00606-10>

- Lawrence, J.R., Swerhone, G.D.W., Kuhlicke, U., Neu, T.R., 2007. In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. *Can. J. Microbiol.* 53, 450–458. <https://doi.org/10.1139/W06-146>
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., 2012. Infections associées aux biofilms: Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale? *Med Sci (Paris)* 28, 727–739. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012288015>
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., Beloin, C., 2014. Tolérance des biofilms aux antibiotiques : comprendre pour mieux traiter. *Journal des Anti-infectieux* 16, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.antinf.2014.04.001>
- Lebeaux, D., Leflon-Guibout, V., Ghigo, J.-M., Beloin, C., 2015. *In vitro* activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or L -arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70, 1704–1712. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv044>
- Lee, B., Haagensen, J.A.J., Ciofu, O., Andersen, J.B., Høiby, N., Molin, S., 2005. Heterogeneity of Biofilms Formed by Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol* 43, 5247–5255. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5247-5255.2005>
- Legaree, B.A., Daniels, K., Weadge, J.T., Cockburn, D., Clarke, A.J., 2007. Function of penicillin-binding protein 2 in viability and morphology of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59, 411–424. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl536>
- Lewis, K., 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 5, 48–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1557>
- Liao, X., Hancock, R.E., 1997a. Susceptibility to beta-lactam antibiotics of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing penicillin-binding protein 3. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1158–1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.5.1158>
- Liao, X., Hancock, R.E., 1997b. Identification of a penicillin-binding protein 3 homolog, PBP3x, in *Pseudomonas aeruginosa*: gene cloning and growth phase-dependent expression. *J Bacteriol* 179, 1490–1496. <https://doi.org/10.1128/jb.179.5.1490-1496.1997>
- Lima, L.M., Silva, B.N.M. da, Barbosa, G., Barreiro, E.J., 2020. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry* 208, 112829. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>
- Locci, R., Peters, G., Pulverer, G., 1981. Microbial colonization of prosthetic devices. I. Microtopographical characteristics of intravenous catheters as detected by scanning electron microscopy. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B* 173, 285–292.

- López-Igual, R., Bernal-Bayard, J., Rodríguez-Patón, A., Ghigo, J.-M., Mazel, D., 2019. Engineered toxin–intein antimicrobials can selectively target and kill antibiotic-resistant bacteria in mixed populations. *Nat Biotechnol* 37, 755–760. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0105-3>
- Lynch, J.P., Clark, N.M., Zhanel, G.G., 2013. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum β -lactamases and carbapenemases). *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 14, 199–210. <https://doi.org/10.1517/14656566.2013.763030>
- Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V., Dideberg, O., Dessen, A., 2006. Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev* 30, 673–691. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00024.x>
- Magnet, S., Bellais, S., Dubost, L., Fourgeaud, M., Mainardi, J.-L., Petit-Frère, S., Marie, A., Mengin-Lecreulx, D., Arthur, M., Gutmann, L., 2007. Identification of the L_D -Transpeptidases Responsible for Attachment of the Braun Lipoprotein to *Escherichia coli* Peptidoglycan. *J Bacteriol* 189, 3927–3931. <https://doi.org/10.1128/JB.00084-07>
- 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. <https://doi.org/10.1128/JB.00025-08>
- Mah, T.-F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., O’Toole, G.A., 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426, 306–310. <https://doi.org/10.1038/nature02122>
- Mainardi, J.-L., Fourgeaud, M., Hugonnet, J.-E., Dubost, L., Brouard, J.-P., Ouazzani, J., Rice, L.B., Gutmann, L., Arthur, M., 2005. A Novel Peptidoglycan Cross-linking Enzyme for a β -Lactam-resistant Transpeptidation Pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 38146–38152. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507384200>
- Mainardi, J.-L., Hugonnet, J.-E., Rusconi, F., Fourgeaud, M., Dubost, L., Mouni, A.N., Delfosse, V., Mayer, C., Gutmann, L., Rice, L.B., Arthur, M., 2007. Unexpected Inhibition of Peptidoglycan LD-Transpeptidase from *Enterococcus faecium* by the β -Lactam Imipenem. *Journal of Biological Chemistry* 282, 30414–30422. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704286200>
- Mainardi, J.-L., Legrand, R., Arthur, M., Schoot, B., van Heijenoort, J., Gutmann, L., 2000. Novel Mechanism of β -Lactam Resistance Due to Bypass of DD-Transpeptidation in *Enterococcus faecium*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 16490–16496. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909877199>
- Mainardi, J.-L., Morel, V., Fourgeaud, M., Cremniter, J., Blanot, D., Legrand, R., Fréhel, C., Arthur, M., van Heijenoort, J., Gutmann, L., 2002. Balance between Two Transpeptidation Mechanisms

- Determines the Expression of β -Lactam Resistance in *Enterococcus faecium*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 35801–35807. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204319200>
- Maleki, A., Ghafourian, S., Pakzad, I., Badakhsh, B., Sadeghifard, N., 2018. *mazE* Antitoxin of Toxin Antitoxin System and *fbpA* as Reliable Targets to Eradication of *Neisseria meningitidis*. *CPD* 24, 1204–1210. <https://doi.org/10.2174/1381612824666171213094730>
- Malinverni, J.C., Silhavy, T.J., 2009. An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the Gram-negative outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 8009–8014. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903229106>
- Mancini, S., Keller, P.M., Greiner, M., Bruderer, V., Imkamp, F., 2019. Detection of NDM-19, a novel variant of the New Delhi metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity under zinc-limited conditions, in Switzerland. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 95, 114851. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.06.003>
- Mandela, E., Stubenrauch, C.J., Ryoo, D., Hwang, H., Cohen, E.J., Torres, V.L., Deo, P., Webb, C.T., Huang, C., Schittenhelm, R.B., Beeby, M., Gumbart, J., Lithgow, T., Hay, I.D., 2022. Adaptation of the periplasm to maintain spatial constraints essential for cell envelope processes and cell viability. *eLife* 11, e73516. <https://doi.org/10.7554/eLife.73516>
- Mark Welch, J.L., Rossetti, B.J., Rieken, C.W., Dewhirst, F.E., Borisy, G.G., 2016. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522149113>
- Marrie, T.J., Nelligan, J., Costerton, J.W., 1982. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation* 66, 1339–1341. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.66.6.1339>
- Martyn, L., Sethia, R., Chon, R., Novotny, L., Goodman, S.D., Elmaraghy, C., Bakaletz, L.O., 2020. Antibodies against the DNABII protein integration host factor (IHF) inhibit sinus implant biofilms. *The Laryngoscope* 130, 1364–1371. <https://doi.org/10.1002/lary.28188>
- Maszewska, A., Zygmunt, M., Grzejdzia, I., Różalski, A., 2018. Use of polyvalent bacteriophages to combat biofilm of *Proteus mirabilis* causing catheter-associated urinary tract infections. *J Appl Microbiol* 125, 1253–1265. <https://doi.org/10.1111/jam.14026>
- McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S., 2012. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* 10, 39–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2695>
- Meddings, J., Rogers, M.A.M., Macy, M., Saint, S., 2010. Systematic Review and Meta-Analysis: Reminder Systems to Reduce Catheter-Associated Urinary Tract Infections and Urinary

- Catheter Use in Hospitalized Patients. *CLIN INFECT DIS* 51, 550–560. <https://doi.org/10.1086/655133>
- Meeske, A.J., Riley, E.P., Robins, W.P., Uehara, T., Mekalanos, J.J., Kahne, D., Walker, S., Kruse, A.C., Bernhardt, T.G., Rudner, D.Z., 2016. SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature* 537, 634–638. <https://doi.org/10.1038/nature19331>
- Meeske, A.J., Sham, L.-T., Kimsey, H., Koo, B.-M., Gross, C.A., Bernhardt, T.G., Rudner, D.Z., 2015. MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 6437–6442. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504967112>
- Menzel, S., Schwarz, N., Haag, F., Koch-Nolte, F., 2018. Nanobody-Based Biologics for Modulating Purinergic Signaling in Inflammation and Immunity. *Front. Pharmacol.* 9, 266. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00266>
- Micoli, F., Bagnoli, F., Rappuoli, R., Serruto, D., 2021. The role of vaccines in combatting antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol* 19, 287–302. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00506-3>
- Mohammadi, T., van Dam, V., Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., Diepeveen-de Bruin, M., Nguyen-Distèche, M., de Kruijff, B., Breukink, E., 2011. Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane: FtsW transports Lipid II across the membrane. *The EMBO Journal* 30, 1425–1432. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.61>
- Mokrzan, E.M., Ahearn, C.P., Buzzo, J.R., Novotny, L.A., Zhang, Y., Goodman, S.D., Bakaletz, L.O., 2020. Nontypeable *Haemophilus influenzae* newly released (NRel) from biofilms by antibody-mediated dispersal versus antibody-mediated disruption are phenotypically distinct. *Biofilm* 2, 100039. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2020.100039>
- Morè, N., Martorana, A.M., Biboy, J., Otten, C., Winkle, M., Serrano, C.K.G., Montón Silva, A., Atkinson, L., Yau, H., Breukink, E., den Blaauwen, T., Vollmer, W., Polissi, A., 2019. Peptidoglycan Remodeling Enables *Escherichia coli* To Survive Severe Outer Membrane Assembly Defect. *mBio* 10, e02729-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02729-18>
- Moyed, H.S., Bertrand, K.P., 1983. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol* 155, 768–775. <https://doi.org/10.1128/jb.155.2.768-775.1983>
- Murakami, K., Ono, T., Viducic, D., Somiya, Y., Kariyama, R., Hori, K., Amoh, T., Hirota, K., Kumon, H., Parsek, M.R., Miyake, Y., 2017. Role of *psl* Genes in Antibiotic Tolerance of Adherent *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 61, e02587-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02587-16>

- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R.A., Dabos, M.L., Zavala, A., Dortet, L., Retailleau, P., Iorga, B.I., 2017. Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 32, 917–919. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>
- Nakagawa, J., Tamaki, S., Tomioka, S., Matsubishi, M., 1984. Functional biosynthesis of cell wall peptidoglycan by polymorphic bifunctional polypeptides. Penicillin-binding protein 1Bs of *Escherichia coli* with activities of transglycosylase and transpeptidase. *Journal of Biological Chemistry* 259, 13937–13946. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)89835-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)89835-0)
- Nichols, W.W., Dorrington, S.M., Slack, M.P., Walmsley, H.L., 1988. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob Agents Chemother* 32, 518–523. <https://doi.org/10.1128/AAC.32.4.518>
- Noguchi, H., Matsubishi, M., Mitsuhashi, S., 1979. Comparative Studies of Penicillin-Binding Proteins in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 100, 41–49. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb02031.x>
- Novotny, L.A., Goodman, S.D., Bakaletz, L.O., 2020. Targeting a bacterial DNABII protein with a chimeric peptide immunogen or humanised monoclonal antibody to prevent or treat recalcitrant biofilm-mediated infections. *eBioMedicine* 59, 102867. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102867>
- Novotny, L.A., Goodman, S.D., Bakaletz, L.O., 2019. Redirecting the immune response towards immunoprotective domains of a DNABII protein resolves experimental otitis media. *npj Vaccines* 4, 43. <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0137-1>
- O’Grady, N.P., Alexander, M., Burns, L.A., Dellinger, E.P., Garland, J., Heard, S.O., Lipsett, P.A., Masur, H., Mermel, L.A., Pearson, M.L., Raad, I.I., Randolph, A.G., Rupp, M.E., Saint, S., the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) (Appendix 1), 2011. Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-related Infections. *Clinical Infectious Diseases* 52, e162–e193. <https://doi.org/10.1093/cid/cir257>
- Okamoto, T., 2002. A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50, 849–856. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf140>
- Oliveira, C., Nasr, A., Brindle, M., Wales, P.W., 2012. Ethanol Locks to Prevent Catheter-Related Bloodstream Infections in Parenteral Nutrition: A Meta-Analysis. *Pediatrics* 129, 318–329. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-1602>
- Orman, M.A., Brynildsen, M.P., 2013. Establishment of a Method To Rapidly Assay Bacterial Persister Metabolism. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 4398–4409. <https://doi.org/10.1128/AAC.00372-13>

- Ostash, B., Walker, S., 2010. Moenomycin family antibiotics: chemical synthesis, biosynthesis, and biological activity. *Nat. Prod. Rep.* 27, 1594. <https://doi.org/10.1039/c001461n>
- P., S.V.V.S.N., P., S.V.V.S., 2020. A Review on Surface Modifications and Coatings on Implants to Prevent Biofilm. *Regen. Eng. Transl. Med.* 6, 330–346. <https://doi.org/10.1007/s40883-019-00116-3>
- Pamp, S.J., Gjermansen, M., Johansen, H.K., Tolker-Nielsen, T., 2008. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Mol Microbiol* 68, 223–240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06152.x>
- Papenfort, K., Bassler, B.L., 2016. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 14, 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
- Park, J.T., Strominger, J.L., 1957. Mode of Action of Penicillin: Biochemical Basis for the Mechanism of Action of Penicillin and for Its Selective Toxicity. *Science* 125, 99–101. <https://doi.org/10.1126/science.125.3238.99>
- Pazos, M., Peters, K., Boes, A., Safaei, Y., Kenward, C., Caveney, N.A., Laguri, C., Breukink, E., Strynadka, N.C.J., Simorre, J.-P., Terrak, M., Vollmer, W., 2020. SPOR Proteins Are Required for Functionality of Class A Penicillin-Binding Proteins in *Escherichia coli*. *mBio* 11, e02796-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02796-20>
- Peltier, J., Courtin, P., El Meouche, I., Lemée, L., Chapot-Chartier, M.-P., Pons, J.-L., 2011. *Clostridium difficile* Has an Original Peptidoglycan Structure with a High Level of N-Acetylglucosamine Deacetylation and Mainly 3-3 Cross-links. *Journal of Biological Chemistry* 286, 29053–29062. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.259150>
- Peters, B.M., Jabra-Rizk, M.A., O'May, G.A., Costerton, J.W., Shirtliff, M.E., 2012. Polymicrobial Interactions: Impact on Pathogenesis and Human Disease. *Clin Microbiol Rev* 25, 193–213. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-11>
- Peters, K., Pazos, M., Edoó, Z., Hugonnet, J.-E., Martorana, A.M., Polissi, A., VanNieuwenhze, M.S., Arthur, M., Vollmer, W., 2018. Copper inhibits peptidoglycan LD-transpeptidases suppressing β -lactam resistance due to bypass of penicillin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 10786–10791. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809285115>
- Petroff, A.P., Wu, T.-D., Liang, B., Mui, J., Guerquin-Kern, J.-L., Vali, H., Rothman, D.H., Bosak, T., 2011. Reaction–diffusion model of nutrient uptake in a biofilm: Theory and experiment. *Journal of Theoretical Biology* 289, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2011.08.004>

- Pires, D.P., Oliveira, H., Melo, L.D.R., Sillankorva, S., Azeredo, J., 2016. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 2141–2151. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7247-0>
- Pisabarro, A.G., de Pedro, M.A., Vázquez, 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. <https://doi.org/10.1128/jb.161.1.238-242.1985>
- Plé, C., Tam, H.-K., Vieira Da Cruz, A., Compagne, N., Jiménez-Castellanos, J.-C., Müller, R.T., Pradel, E., Foong, W.E., Mallocci, G., Ballée, A., Kirchner, M.A., Moshfegh, P., Herledan, A., Herrmann, A., Deprez, B., Willand, N., Vargiu, A.V., Pos, K.M., Flipo, M., Hartkoorn, R.C., 2022. Pyridylpiperazine-based allosteric inhibitors of RND-type multidrug efflux pumps. *Nat Commun* 13, 115. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27726-2>
- Pletzer, D., Coleman, S.R., Hancock, R.E., 2016. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Current Opinion in Microbiology* 33, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.016>
- Prosser, G.A., de Carvalho, L.P.S., 2013. Metabolomics Reveal D -Alanine: D -Alanine Ligase As the Target of D -Cycloserine in *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Med. Chem. Lett.* 4, 1233–1237. <https://doi.org/10.1021/ml400349n>
- Quintela, J., CaparrÃ³s, M., Pedro, M.A., 1995. Variability of peptidoglycan structural parameters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 125, 95–100. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07341.x>
- Raad, I., Chaftari, A.-M., Zakhour, R., Jordan, M., Al Hamal, Z., Jiang, Y., Yousif, A., Garoge, K., Mulanovich, V., Viola, G.M., Kanj, S., Pravinkumar, E., Rosenblatt, J., Hachem, R., 2016. Successful Salvage of Central Venous Catheters in Patients with Catheter-Related or Central Line-Associated Bloodstream Infections by Using a Catheter Lock Solution Consisting of Minocycline, EDTA, and 25% Ethanol. *Antimicrob Agents Chemother* 60, 3426–3432. <https://doi.org/10.1128/AAC.02565-15>
- Raad, I.I., Fang, X., Keutgen, X.M., Jiang, Y., Sherertz, R., Hachem, R., 2008. The role of chelators in preventing biofilm formation and catheter-related bloodstream infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* 21, 385–392. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32830634d8>
- Raetz, C.R., Dowhan, W., 1990. Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 265, 1235–1238.
- Raetz, C.R.H., Whitfield, C., 2002. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>

- Ramos, G.P., Rocha, J.L., Tuon, F.F., 2013. Seasonal humidity may influence *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired infection rates. *International Journal of Infectious Diseases* 17, e757–e761. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.03.002>
- Rendueles, O., Ghigo, J.-M., 2012. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev* 36, 972–989. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x>
- Rimal, B., Senzani, S., Ealand, C., Lamichhane, G., Kana, B., Kim, S.J., 2022. Peptidoglycan compositional analysis of *Mycobacterium smegmatis* using high-resolution LC–MS. *Sci Rep* 12, 11061. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15324-1>
- Rodríguez-Martínez, J.M., Ballesta, S., Pascual, Á., 2007. Activity and penetration of fosfomycin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 30, 366–368. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.05.005>
- Rollauer, S.E., Soorshjani, M.A., Noinaj, N., Buchanan, S.K., 2015. Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370, 20150023. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0023>
- Ropp, P.A., Hu, M., Olesky, M., Nicholas, R.A., 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*. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 769–777. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.769-777.2002>
- Rotem, E., Loinger, A., Ronin, I., Levin-Reisman, I., Gabay, C., Shoresh, N., Biham, O., Balaban, N.Q., 2010. Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 12541–12546. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004333107>
- Równicki, M., Pieńko, T., Czarnecki, J., Kolanowska, M., Bartosik, D., Trylska, J., 2018. Artificial Activation of *Escherichia coli* mazEF and hipBA Toxin–Antitoxin Systems by Antisense Peptide Nucleic Acids as an Antibacterial Strategy. *Front. Microbiol.* 9, 2870. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02870>
- Rubino, F.A., Kumar, S., Ruiz, N., Walker, S., Kahne, D.E., 2018. Membrane Potential Is Required for MurJ Function. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 4481–4484. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b00942>
- Ruiz, N., 2008. Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. *PNAS* 105, 15553–15557. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808352105>
- Rumbaugh, K.P., Sauer, K., 2020. Biofilm dispersion. *Nat Rev Microbiol* 18, 571–586. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>

- Sacco, E., Cortes, M., Josseaume, N., Bouchier, C., Dubée, V., Hugonnet, J.-E., Mainardi, J.-L., Rice, L.B., Arthur, M., 2015. Mutation Landscape of Acquired Cross-Resistance to Glycopeptide and β -Lactam Antibiotics in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 5306–5315. <https://doi.org/10.1128/AAC.00634-15>
- Sacco, E., Cortes, M., Josseaume, N., Rice, L.B., Mainardi, J.-L., Arthur, M., 2014. Serine/Threonine Protein Phosphatase-Mediated Control of the Peptidoglycan Cross-Linking L, D - Transpeptidase Pathway in *Enterococcus faecium*. *mBio* 5, e01446-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01446-14>
- Sacco, E., Hugonnet, J.-E., Josseaume, N., Cremniter, J., Dubost, L., Marie, A., Patin, D., Blanot, D., Rice, L.B., Mainardi, J.-L., Arthur, M., 2010. Activation of the l,d-transpeptidation peptidoglycan cross-linking pathway by a metallo-d,d-carboxypeptidase in *Enterococcus faecium*. *Molecular Microbiology* 75, 874–885. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07014.x>
- Sahni, K., Khashai, F., 2016. Exploring Mechanisms of Biofilm Removal. *Dentistry* 06. <https://doi.org/10.4172/2161-1122.1000371>
- Salzer, A., Keinhörster, D., Kästle, C., Kästle, B., Wolz, C., 2020. Small Alarmone Synthetases RelP and RelQ of *Staphylococcus aureus* Are Involved in Biofilm Formation and Maintenance Under Cell Wall Stress Conditions. *Front. Microbiol.* 11, 575882. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.575882>
- Sanders, A.N., Pavelka, M.S., 2013. Phenotypic analysis of *Escherichia coli* mutants lacking l,d-transpeptidases. *Microbiology* 159, 1842–1852. <https://doi.org/10.1099/mic.0.069211-0>
- Sandoz, K.M., Moore, R.A., Beare, P.A., Patel, A.V., Smith, R.E., Bern, M., Hwang, H., Cooper, C.J., Priola, S.A., Parks, J.M., Gumbart, J.C., Mesnage, S., Heinzen, R.A., 2021. β -Barrel proteins tether the outer membrane in many Gram-negative bacteria. *Nat Microbiol* 6, 19–26. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00798-4>
- Sauer, K., Cullen, M.C., Rickard, A.H., Zeef, L.A.H., Davies, D.G., Gilbert, P., 2004. Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm. *J Bacteriol* 186, 7312–7326. <https://doi.org/10.1128/JB.186.21.7312-7326.2004>
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., Charlier, P., 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32, 234–258. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
- Sayed, N., Nonin-Lecomte, S., Réty, S., Felden, B., 2012. Functional and Structural Insights of a *Staphylococcus aureus* Apoptotic-like Membrane Peptide from a Toxin-Antitoxin Module. *Journal of Biological Chemistry* 287, 43454–43463. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.402693>

- Schiessler, M.M., Darwin, L.M., Phipps, A.R., Hegemann, L.R., Heybrock, B.S., Macfadyen, A.J., 2019. Don't Have a Doubt, Get the Catheter Out: A Nurse-Driven CAUTI Prevention Protocol. *Pediatric Quality & Safety* 4, e183. <https://doi.org/10.1097/pq9.0000000000000183>
- Schoonmaker, M.K., Bishai, W.R., Lamichhane, G., 2014. Nonclassical Transpeptidases of *Mycobacterium tuberculosis* Alter Cell Size, Morphology, the Cytosolic Matrix, Protein Localization, Virulence, and Resistance to β -Lactams. *J Bacteriol* 196, 1394–1402. <https://doi.org/10.1128/JB.01396-13>
- Schumacher, M.A., Balani, P., Min, J., Chinnam, N.B., Hansen, S., Vulić, M., Lewis, K., Brennan, R.G., 2015. HipBA–promoter structures reveal the basis of heritable multidrug tolerance. *Nature* 524, 59–64. <https://doi.org/10.1038/nature14662>
- Schwarz, U., Asmus, A., Frank, H., 1969. Autolytic enzymes and cell division of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 41, 419–429. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(69\)90285-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(69)90285-X)
- Schwechheimer, C., Kulp, A., Kuehn, M.J., 2014. Modulation of bacterial outer membrane vesicle production by envelope structure and content. *BMC Microbiol* 14, 324. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0324-1>
- Seth, A.K., Geringer, M.R., Nguyen, K.T., Agnew, S.P., Dumanian, Z., Galiano, R.D., Leung, K.P., Mustoe, T.A., Hong, S.J., 2013. Bacteriophage Therapy for *Staphylococcus aureus* Biofilm–Infected Wounds: A New Approach to Chronic Wound Care. *Plastic and Reconstructive Surgery* 131, 225–234. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31827e47cd>
- Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A.B., Kaldalu, N., Kurg, K., Lewis, K., 2006. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol* 6, 53. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-53>
- Sham, L.-T., Butler, E.K., Lebar, M.D., Kahne, D., Bernhardt, T.G., Ruiz, N., 2014. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science* 345, 220–222. <https://doi.org/10.1126/science.1254522>
- Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agno, M., Phillips, A.D., Nataro, J.P., 2001. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*: Biofilm formation by EAEC. *Molecular Microbiology* 41, 983–997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02512.x>
- Shields, C.W., Evans, M.A., Wang, L.L.-W., Baugh, N., Iyer, S., Wu, D., Zhao, Z., Pusuluri, A., Ukidve, A., Pan, D.C., Mitragotri, S., 2020. Cellular backpacks for macrophage immunotherapy. *Sci Adv* 6, eaaz6579. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz6579>
- Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S., 2010. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a000414–a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>

- Simmons, E.L., Bond, M.C., Koskella, B., Drescher, K., Bucci, V., Nadell, C.D., 2020. Biofilm Structure Promotes Coexistence of Phage-Resistant and Phage-Susceptible Bacteria. *mSystems* 5, e00877-19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00877-19>
- Sjodt, M., Brock, K., Dobihal, G., Rohs, P.D.A., Green, A.G., Hopf, T.A., Meeske, A.J., Srisuknimit, V., Kahne, D., Walker, S., Marks, D.S., Bernhardt, T.G., Rudner, D.Z., Kruse, A.C., 2018. Structure of the peptidoglycan polymerase RodA resolved by evolutionary coupling analysis. *Nature* 556, 118–121. <https://doi.org/10.1038/nature25985>
- Sjodt, M., Rohs, P.D.A., Gilman, M.S.A., Erlandson, S.C., Zheng, S., Green, A.G., Brock, K.P., Taguchi, A., Kahne, D., Walker, S., Marks, D.S., Rudner, D.Z., Bernhardt, T.G., Kruse, A.C., 2020. Structural coordination of polymerization and crosslinking by a SEDS–bPBP peptidoglycan synthase complex. *Nat Microbiol* 5, 813–820. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0687-z>
- Song, J., Xie, G., Elf, P.K., Young, K.D., Jensen, R.A., 1998. Comparative analysis of *Pseudomonas aeruginosa* penicillin-binding protein 7 in the context of its membership in the family of low-molecular-mass PBPs. *Microbiology* 144, 975–983. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-4-975>
- Spratt, B.G., Pardee, A.B., 1975. Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. *Nature* 254, 516–517. <https://doi.org/10.1038/254516a0>
- Stewart, P.S., 2015. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbiol Spectr* 3, 3.3.07. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014>
- Stewart, P.S., 2003. Diffusion in Biofilms. *J Bacteriol* 185, 1485–1491. <https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1485-1491.2003>
- Stewart, P.S., Franklin, M.J., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 6, 199–210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
- Stewart, P.S., Franklin, M.J., Williamson, K.S., Folsom, J.P., Boegli, L., James, G.A., 2015. Contribution of Stress Responses to Antibiotic Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 3838–3847. <https://doi.org/10.1128/AAC.00433-15>
- Stewart, P.S., Williamson, K.S., Boegli, L., Hamerly, T., White, B., Scott, L., Hu, X., Mumeey, B.M., Franklin, M.J., Bothner, B., Vital-Lopez, F.G., Wallqvist, A., James, G.A., 2022. Search for a Shared Genetic or Biochemical Basis for Biofilm Tolerance to Antibiotics across Bacterial Species. *Antimicrob Agents Chemother* 66, e00021-22. <https://doi.org/10.1128/aac.00021-22>
- Stone, K.J., Strominger, J.L., 1971. Mechanism of Action of Bacitracin: Complexation with Metal Ion and C₅₅-Isoprenyl Pyrophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 3223–3227. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.12.3223>

- Stoodley, P., deBeer, D., Lewandowski, Z., 1994. Liquid Flow in Biofilm Systems. *Appl Environ Microbiol* 60, 2711–2716. <https://doi.org/10.1128/aem.60.8.2711-2716.1994>
- Sun, J., Rutherford, S.T., Silhavy, T.J., Huang, K.C., 2022. Physical properties of the bacterial outer membrane. *Nat Rev Microbiol* 20, 236–248. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00638-0>
- Szafrański, S.P., Winkel, A., Stiesch, M., 2017. The use of bacteriophages to biocontrol oral biofilms. *Journal of Biotechnology* 250, 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.01.002>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E.M., Houchens, C.R., Grayson, M.L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N., Aboderin, A.O., Al-Abri, S.S., Awang Jalil, N., Benzonana, N., Bhattacharya, S., Brink, A.J., Burkert, F.R., Cars, O., Cornaglia, G., Dyar, O.J., Friedrich, A.W., Gales, A.C., Gandra, S., Giske, C.G., Goff, D.A., Goossens, H., Gottlieb, T., Guzman Blanco, M., Hryniewicz, W., Kattula, D., Jinks, T., Kanj, S.S., Kerr, L., Kieny, M.-P., Kim, Y.S., Kozlov, R.S., Labarca, J., Laxminarayan, R., Leder, K., Leibovici, L., Levy-Hara, G., Littman, J., Malhotra-Kumar, S., Manchanda, V., Moja, L., Ndoye, B., Pan, A., Paterson, D.L., Paul, M., Qiu, H., Ramon-Pardo, P., Rodríguez-Baño, J., Sanguinetti, M., Sengupta, S., Sharland, M., Si-Mehand, M., Silver, L.L., Song, W., Steinbakk, M., Thomsen, J., Thwaites, G.E., van der Meer, J.W., Van Kinh, N., Vega, S., Villegas, M.V., Wechsler-Fördös, A., Wertheim, H.F.L., Wesangula, E., Woodford, N., Yilmaz, F.O., Zorzet, A., 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases* 18, 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Taguchi, A., Welsh, M.A., Marmont, L.S., Lee, W., Sjodt, M., Kruse, A.C., Kahne, D., Bernhardt, T.G., Walker, S., 2019. FtsW is a peptidoglycan polymerase that is functional only in complex with its cognate penicillin-binding protein. *Nat Microbiol* 4, 587–594. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0345-x>
- Tanaka, G., Shigeta, M., Komatsuzawa, H., Sugai, M., Suginaka, H., Usui, T., 1999. Effect of the Growth Rate of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms on the Susceptibility to Antimicrobial Agents: β -Lactams and Fluoroquinolones. *Chemotherapy* 45, 28–36. <https://doi.org/10.1159/000007162>
- Thappeta, K.R.V., Vikhe, Y.S., Yong, A.M.H., Chan-Park, M.B., Kline, K.A., 2020. Combined Efficacy of an Antimicrobial Cationic Peptide Polymer with Conventional Antibiotics to Combat Multidrug-Resistant Pathogens. *ACS Infect. Dis.* 6, 1228–1237. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00016>
- Theuretzbacher, U., Outtersson, K., Engel, A., Karlén, A., 2020. The global preclinical antibacterial pipeline. *Nat Rev Microbiol* 18, 275–285. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0288-0>

- Thurlow, L.R., Hanke, M.L., Fritz, T., Angle, A., Aldrich, A., Williams, S.H., Engebretsen, I.L., Bayles, K.W., Horswill, A.R., Kielian, T., 2011. *Staphylococcus aureus* Biofilms Prevent Macrophage Phagocytosis and Attenuate Inflammation In Vivo. *The Journal of Immunology* 186, 6585–6596. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002794>
- Tietgen, M., Kramer, J.S., Brunst, S., Djahanschiri, B., Wohra, S., Higgins, P.G., Weidensdorfer, M., Riedel-Christ, S., Pos, K.M., Gonzaga, A., Steglich, M., Nübel, U., Ebersberger, I., Proschak, E., Göttig, S., 2019. Identification of the novel class D β -lactamase OXA-679 involved in carbapenem resistance in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74, 1494–1502. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz080>
- Tipper, D.J., Strominger, J.L., 1965. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 1133–1141. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.4.1133>
- Tipper, D.J., Strominger, J.L., Ensign, J.C., 1967. Structure of the Cell Wall of *Staphylococcus aureus*, Strain Copenhagen. VII. Mode of Action of the Bacteriolytic Peptidase from *Myxobacter* and the Isolation of Intact Cell Wall Polysaccharides *. *Biochemistry* 6, 906–920. <https://doi.org/10.1021/bi00855a035>
- Tooke, C.L., Hinchliffe, P., Bragginton, E.C., Colenso, C.K., Hirvonen, V.H.A., Takebayashi, Y., Spencer, J., 2019. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology* 431, 3472–3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- Triboulet, S., Dubée, V., Lecoq, L., Bougault, C., Mainardi, J.-L., Rice, L.B., Ethève-Quellejeu, M., Gutmann, L., Marie, A., Dubost, L., Hugonnet, J.-E., Simorre, J.-P., Arthur, M., 2013. Kinetic Features of L,D-Transpeptidase Inactivation Critical for β -Lactam Antibacterial Activity. *PLoS ONE* 8, e67831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067831>
- Tuomanen, E., 1986. Phenotypic Tolerance: The Search for β -Lactam Antibiotics That Kill Nongrowing Bacteria. *Clinical Infectious Diseases* 8, S279–S291. https://doi.org/10.1093/clinids/8.Supplement_3.S279
- Tuomanen, E., Cozens, R., Tosch, W., Zak, O., Tomasz, A., 1986. The Rate of Killing of *Escherichia coli* by β -Lactam Antibiotics Is Strictly Proportional to the Rate of Bacterial Growth. *Microbiology* 132, 1297–1304. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-5-1297>
- Ude, J., Tripathi, V., Buyck, J.M., Söderholm, S., Cunrath, O., Fanous, J., Claudi, B., Egli, A., Schleberger, C., Hiller, S., Bumann, D., 2021. Outer membrane permeability: Antimicrobials and diverse nutrients bypass porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118, e2107644118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2107644118>

- Vilain, S., Pretorius, J.M., Theron, J., Brözel, V.S., 2009. DNA as an Adhesin: *Bacillus cereus* Requires Extracellular DNA To Form Biofilms. *Appl Environ Microbiol* 75, 2861–2868. <https://doi.org/10.1128/AEM.01317-08>
- Voedts, H., Dorchêne, D., Lodge, A., Vollmer, W., Arthur, M., Hugonnet, J., 2021. Role of endopeptidases in peptidoglycan synthesis mediated by alternative cross-linking enzymes in *Escherichia coli*. *EMBO J* 40. <https://doi.org/10.15252/embj.2021108126>
- Vollmer, W., Blanot, D., De Pedro, M.A., 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 32, 149–167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
- Ward, J.B., 1973. The chain length of the glycans in bacterial cell walls. *Biochemical Journal* 133, 395–398. <https://doi.org/10.1042/bj1330395>
- Warth, A.D., Strominger, J.L., 1971. Structure of the peptidoglycan from vegetative cell walls of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 10, 4349–4358. <https://doi.org/10.1021/bi00800a001>
- Wen, Z., Zhang, J.-R., 2015. Bacterial Capsules, in: *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier, pp. 33–53. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00003-2>
- Wessel, A.K., Liew, J., Kwon, T., Marcotte, E.M., Whiteley, M., 2013. Role of *Pseudomonas aeruginosa* Peptidoglycan-Associated Outer Membrane Proteins in Vesicle Formation. *J Bacteriol* 195, 213–219. <https://doi.org/10.1128/JB.01253-12>
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S., 2002. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science* 295, 1487–1487. <https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487>
- Wille, J., Coenye, T., 2020. Biofilm dispersion: The key to biofilm eradication or opening Pandora’s box? *Biofilm* 2, 100027. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2020.100027>
- Winkle, M., Hernández-Rocamora, V.M., Pullela, K., Goodall, E.C.A., Martorana, A.M., Gray, J., Henderson, I.R., Polissi, A., Vollmer, W., 2021. DpaA Detaches Braun’s Lipoprotein from Peptidoglycan. *mBio* 12, e00836-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.00836-21>
- Wise, E.M., Park, J.T., 1965. Penicillin: its basic site of action as an inhibitor of a peptide cross-linking reaction in cell wall mucopeptide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 75–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.1.75>
- Wolcott, R., Costerton, J.W., Raoult, D., Cutler, S.J., 2013. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clinical Microbiology and Infection* 19, 107–112. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.04001.x>
- Wolf, A.J., Underhill, D.M., 2018. Peptidoglycan recognition by the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 18, 243–254. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.136>

- World Health Organization, 2011. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. World Health Organization, Geneva.
- Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Høiby, N., Molin, S., Song, Z., 2011. Current understanding of multi-species biofilms. *Int J Oral Sci* 3, 74–81. <https://doi.org/10.4248/IJOS11027>
- Yoon, E.-J., Choi, Y.J., Park, S.H., Shin, J.H., Park, S.G., Choi, J.R., Jeong, S.H., 2020. A Novel KPC Variant KPC-55 in *Klebsiella pneumoniae* ST307 of Reinforced Meropenem-Hydrolyzing Activity. *Front. Microbiol.* 11, 561317. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.561317>
- Zapun, A., Contreras-Martel, C., Vernet, T., 2008. Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* 32, 361–385. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x>
- Zheng, Z., Stewart, P.S., 2002. Penetration of Rifampin through *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 900–903. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.900-903.2002>
- Zobell, C.E., 1943. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J Bacteriol* 46, 39–56. <https://doi.org/10.1128/jb.46.1.39-56.1943>

Liens hypertextes

Research on microbial biofilms, NIH PA-03-047 :

<https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-03-047.html>

Immunology of biofilms, NIH PA-06-537 :

<https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-06-537.html>

WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, 27 February 2017:

<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Étude clinique CATH-GE :

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04789928>

Pseudomonas Genome DataBase :

<https://www.pseudomonas.com>

EcoCyc :

<https://ecocyc.org>

Résumé :

Adaptation de l'enveloppe bactérienne à la croissance en biofilm

Le peptidoglycane est une macromolécule essentielle et spécifique de la paroi bactérienne, qui maintient la forme des cellules, assure une protection mécanique contre la pression osmotique exercée par le cytoplasme et sert à l'ancrage de polymères de l'enveloppe. Il est réticulé par deux familles d'enzymes, les PLP et les LDT, dont la contribution relative est variable et qui sont les cibles des antibiotiques appartenant à la famille des β -lactamines. Tandis que les PLP sont potentiellement inhibées par tous les antibiotiques de la famille des β -lactamines, les LDT sont efficacement inhibées par une seule classe de β -lactamines, les carbapénèmes. Les travaux de thèse explorent le rôle des LDT dans l'adaptation de *Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* à la croissance en biofilm. Nous avons identifié et caractérisé fonctionnellement trois paralogues des LDT chez *P. aeruginosa*. En parallèle, le rôle des six paralogues des LDT de *E. coli* a été évalué grâce à la construction de délétions multiples. Chez les deux espèces bactériennes étudiées, la croissance en biofilm est associée à une augmentation significative de la contribution des LDT à la polymérisation du peptidoglycane. Les LDT jouent également un rôle critique dans la stabilisation de l'enveloppe et dans le contrôle du relargage de protéines périplasmiques dans le milieu de culture des bactéries. Ainsi, les LDT pourraient être des cibles exploitables pour lutter contre la formation de biofilms bactériens.

Mots clés : biofilm, *Escherichia coli*, L,D-transpeptidase, peptidoglycane, *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract:

Adaptation of the bacterial envelope to growth in biofilm

Peptidoglycan is an essential and specific macromolecule of the bacterial envelope, which maintains the shape of cells, provides mechanical protection against the osmotic pressure of the cytoplasm, and serves as an anchor for envelope polymers. Peptidoglycan is cross-linked by two families of enzymes, PBPs and LDTs, whose relative contribution is variable, and which are the targets of antibiotics belonging to the β -lactam family. While PBPs are potentially inhibited by all β -lactam antibiotics, LDTs are effectively inhibited by only one class of β -lactam antibiotics, the carbapenems. This thesis explores the role of LDTs in the adaptation of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* to growth in biofilm. We have identified and functionally characterized three LDT paralogs in *P. aeruginosa*. In parallel, the role of the six LDT paralogs of *E. coli* was evaluated by constructing multiple deletions. In both bacterial species studied, growth in biofilm is associated with a significant increase in the contribution of LDTs to peptidoglycan polymerization. LDTs also play a critical role in stabilizing the envelope and in preventing the release of periplasmic proteins into the bacterial culture medium. Thus, LDTs could be actionable targets to combat bacterial biofilms.

Keywords: biofilm, *Escherichia coli*, L,D-transpeptidase, peptidoglycan, *Pseudomonas aeruginosa*