



**HAL**  
open science

# Division cellulaire de la bactérie *Streptococcus pneumoniae*: étude de la phosphorylation de la protéine MapZ et caractérisation de la protéine CopD

Cassandra Lenoir

► **To cite this version:**

Cassandra Lenoir. Division cellulaire de la bactérie *Streptococcus pneumoniae*: étude de la phosphorylation de la protéine MapZ et caractérisation de la protéine CopD. Microbiologie et Parasitologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT: 2023LYO10257 . tel-04738588

**HAL Id: tel-04738588**

**<https://theses.hal.science/tel-04738588v1>**

Submitted on 15 Oct 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.

**THESE de DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

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

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

Soutenue publiquement le 07/12/2023, par :  
**Cassandra LENOIR**

---

**Division cellulaire de la bactérie  
*Streptococcus pneumoniae* : Etude de la  
phosphorylation de la protéine MapZ et  
caractérisation de la protéine CopD**

---

Devant le jury composé de :

Pr. DOUBLET Patricia  
Dr. MORLOT Cécile  
Dr. WEHENKEL Anne-Marie  
Dr. JOHNSTON Calum  
Dr. GRANGEASSE Christophe  
Dr. DUCRET Adrien

Pr UCBL  
DR CNRS  
CR CNRS  
CR CNRS  
DR CNRS  
CR CNRS

Président.e  
Rapporteure  
Rapporteure  
Examineur  
Directeur de thèse  
Co-directeur



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

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. Pilippe CHEVALIER
Vice-présidente de la Commission de la formation et de la Vie Universitaire	M. Christophe VITON
Vice-président de la Commission de Recherche	M. Philippe CASSAGNAU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

### **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directrice : M. Philippe PAPAREL
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. Jean-Christophe MAURIN
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISPB)	Directeur : M. Claude DUSSART
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Jacques LUAUTE

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

UFR Faculté des Sciences	M. Bruno ANDRIOLETTI
Département Génie Electrique et des procédés (GEP)	Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Mme Saida BOUAKAZ BRONDEL
Département Mécanique	M. Marc BUFFAT
UFR Biosciences	Mme Kathrin GIESELER
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	M. Guillaume BODET
Observatoire de Lyon	M. Bruno GUIDERDONI
Polytech Lyon	M. Emmanuel PERRIN
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1 (IUT)	M. Michel MASSENZIO
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	M. Nicolas LEBOISNE
Institut National Supérieur du Professorat et de l'Education (INSPé)	M. Pierre CHAREYRO



**Titre :** Division cellulaire de la bactérie *Streptococcus pneumoniae* : Etude de la phosphorylation de la protéine MapZ et caractérisation de la protéine CopD.

**Résumé :** La bactérie *Streptococcus pneumoniae*, également appelée pneumocoque, est un pathogène humain responsable de pneumonies, de méningites ou encore de septicémies. Parmi les différentes stratégies de lutte contre l'émergence de souches antibiorésistantes, l'étude des mécanismes de régulation de la division cellulaire de cette bactérie représente un réel enjeu pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. L'objectif de ma thèse a été d'étudier les mécanismes de régulation de la division cellulaire. D'une part, j'ai identifié un nouveau partenaire de la protéine MapZ, la *balise moléculaire* nécessaire au positionnement de la machinerie de division (divisome) au centre de la cellule. J'ai montré que MapZ interagit avec la protéine EzrA et que cette interaction est modulée par la phosphorylation de MapZ. J'ai également montré que cette interaction influence la dynamique de EzrA et qu'elle contribue ainsi à la stabilité du divisome au site de division. D'autre part, j'ai identifié une nouvelle protéine de morphogenèse du pneumocoque, appelée CopD. CopD interagit directement avec deux Penicillin-Binding Proteins (PBPs), PBP1a et PBP2b, et contrôle leur dynamique spatio-temporelle. Mes travaux de thèse participent à la compréhension des mécanismes de régulation de la division cellulaire et de l'assemblage de la paroi cellulaire, des processus indispensables à la survie de la bactérie.

**Mots clés :** *Streptococcus pneumoniae*, phosphorylation, division cellulaire, morphogenèse, régulation des PBPs

**Title:** Cell division of *Streptococcus pneumoniae*: Study of MapZ phosphorylation and characterization of CopD.

**Abstract:** *Streptococcus pneumoniae*, also known as pneumococcus, is a human pathogen responsible for pneumonia, meningitidis and septicemia. Among the various strategies to combat the emergence of antibiotic-resistant strains, the study of cell division regulation mechanisms represents a significant challenge for identifying new therapeutic targets. The aim of my thesis was to investigate the mechanisms of cell division regulation. Firstly, I identified a new partner of the protein MapZ, the molecular beacon of the divisome. I showed that MapZ interacts with the protein EzrA and that this interaction is modulated by the phosphorylation of MapZ. I also showed that this interaction is modulated by the phosphorylation of MapZ and could constitute an additional level of regulation of cell division. Secondly, I identified a new pneumococcal morphogenesis protein called CopD. This protein directly interacts with the Penicillin-binding proteins (PBPs) PBP1a and PBP2b and controls their dynamics in time and space. My thesis work contributes to the understanding of the mechanisms regulating cell division and cell wall assembly, processes essential for the survival of the bacterium.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*, phosphorylation, cell division, morphogenesis, PBP regulation

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE : Laboratory of Molecular Microbiology and Structural Biochemistry (MMSB) - UMR 5086 - CNRS  
IBCP, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 07, France



## Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés dans l'équipe « Bactéries Pathogènes et Phosphorylation des Protéines » du Dr Christophe Grangeasse, au sein de l'unité Molecular Microbiology and Structural Biochemistry (UMR5086) à Lyon, sous la direction scientifique des Dr Christophe Grangeasse et Adrien Ducret.

Mesdames et Messieurs les membres du jury, je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour l'attention que vous porterez à mes travaux de thèse. Je remercie les Dr Cecile Morlot et Anne-Marie Wehenkel d'avoir accepté d'évaluer mes travaux. Je remercie le Dr Calum Johnston et la Pr Patricia Doublet d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je tiens également à remercier les Dr Nathalie Campo et Suzanna Salcedo pour avoir participé à mon comité de thèse, pour vos commentaires constructifs sur mon travail, votre accompagnement et vos encouragements.

A mon directeur de thèse, Christophe Grangeasse, je te remercie pour ton accompagnement et ton soutien tout au long de cette aventure de recherche. Tes conseils ont été essentiels pour l'aboutissement de cette thèse et pour la suite de ma carrière. Je suis reconnaissante de la confiance que tu m'as accordée et de la liberté que tu m'as donnée pour explorer mes intérêts de recherche.

A mon encadrant, Adrien Ducret, merci pour ton accompagnement au quotidien, ton expertise et tes conseils. Merci de m'avoir soutenue dans mes projets de recherche. Grâce à toi, j'ai acquis des compétences essentielles pour ma future carrière et je suis convaincue que ces enseignements me serviront tout au long de ma vie.

Je remercie également toutes les personnes qui ont contribué à mes travaux de recherche, notamment Virginie Gueguen-Chaignon, Adeline Page, Frédéric Delolme de la plateforme *Protein science facility* pour leur expertise et leurs conseils. Je remercie aussi toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de ma thèse : Patricia, Dorothee, Souad, Annick, les membres de l'équipe de la maintenance et du centre de ressources informatiques.

Merci aux personnes que j'ai croisées sur mon parcours scientifique et qui m'ont donnée envie de poursuivre ce chemin, en particulier les personnes qui ont travaillé avec moi à l'IRCELyon : Chantal Guillard et Christophe Gilbert, Frederick Dappozze, Marwa Hamandi, Laure Peruchon et Lina Lamaà. Mes stages auprès de vous ainsi que vos précieux conseils ont directement contribué à mon attrait pour la recherche. Je remercie également le Dr Florence Wisniewski-Dyé, pour son accompagnement dans mon parcours étudiant et professionnel.

Je tiens également à remercier tous les membres de mon équipe de recherche, actuels ou passés, qui ont tous contribué à ma réussite et à mon épanouissement.

Merci à Chantal pour ta gentillesse et ta disponibilité, tu rends la vie au laboratoire beaucoup plus facile et agréable. Je te souhaite le meilleur.

Merci à Stéphanie et à Sébastien pour vos précieux conseils. Merci à Jean-Pierre pour nos discussions et pour ton aide pour le Biacore. Merci à Romain pour tes recos de films (promis dès que j'ai soutenu ma thèse je regarde Le grand bleu) et pour le temps que tu prends pour discuter avec nous. Merci à Céline pour ton accompagnement dès mon arrivée dans l'équipe, pour tes conseils scientifiques et personnels. Merci pour ton engagement auprès de l'équipe et pour ton rôle de manager, qui je sais n'est pas toujours facile. Merci à Sylvie d'être notre référente permanente (titre obtenu sans ton accord je sais), merci pour les pauses café, merci de nous redonner de la motivation quand on rate nos manips. Je retiendrais ta bienveillance, ton sourire et ton algorithme Instagram atypique.

Pour le paragraphe qui va suivre, et pour des raisons qui seront évidentes pour certains, l'ordre d'apparition des remerciements a été tiré au sort.

Martha : Merci pour les pauses café où on rit beaucoup, merci pour tes conseils, merci pour le temps que tu partages avec nous. Bonne chance et beaucoup de bonheur pour la suite !

Alexia : La maman du groupe, tu vas me manquer. Tous les moments passés avec toi étaient merveilleux, tu es notre petit rayon de soleil ! Je te souhaite de très belles aventures au Danemark.

Ruby : Merci pour ta bonne humeur, pour ces 6 mois partagés au labo avec nous et pour tout ce temps passé ensemble. J'espère qu'on t'a bien accueillie en France et que tu es très heureuse. J'espère te revoir bientôt.

Mélisse : Merci pour tes phrases inspirantes (possible que j'en affiche une chez moi, je te tiendrai au courant), merci d'être toujours à l'écoute. Ta force et ta détermination m'inspirent au quotidien, je te souhaite beaucoup de bonheur.

Margot : Merci de partager tous ces moments de vie avec nous, merci pour ton écoute, merci de me faire rire. Tu vas me manquer, je te souhaite le meilleur pour ton postdoc.

Nikos : Merci pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble. J'espère que tu es très heureux, je te souhaite beaucoup de réussite.

Cassandra : Merci pour ton soutien et ton écoute. Merci de partager les pauses café avec nous et de nous apporter des bonbons et des gâteaux pour les jours difficiles.

Marine : Merci d'avoir partagé avec nous de nombreuses tartes flambées et autres brunchs. Je suis ravie d'avoir partagé ces moments avec toi, bonne chance pour la suite.

Mathilde : Merci d'avoir partagé tous ces bons moments avec moi. Je te souhaite beaucoup de réussite et de bonheur.

Hugo : J'ai été ravie d'avoir encadré ton premier stage au MMSB et j'ai beaucoup apprécié ton aide et ta présence. Merci pour tous les bons moments qu'on a partagés, merci d'avoir été mon binôme de biochimie, la relève est parfaitement assurée par Cassandra 2 ! Je te souhaite le meilleur.

Linus : Avant dernier, tu y étais presque ! Merci d'être toujours bienveillant et toujours à l'écoute. Merci à toi et à tes parents de nous avoir accueillis en Alsace, j'ai détesté

les marchés de Noël mais j'ai adoré ta famille. Tu seras toujours le bienvenu à Oyeu, le karaoké t'attends. Tu mérites le meilleur, je te souhaite beaucoup de réussite.

Margaux : La dernière place (et à ce qu'il paraît la meilleure ?) est pour toi. Merci pour ton soutien et ta générosité. Merci pour tous nos moments partagés. J'ai de supers souvenirs avec toi, les soirées passées ensemble, les journées chez mes parents, les conférences embarquées... Je te souhaite beaucoup de réussite et beaucoup de bonheur.

Merci aux personnes des autres équipes avec lesquelles j'ai aimé discuter et partager des bons moments : Camille, Lina, Marine, Chloé, Kevin, Loïc, Jorgaq, Amélie, Julie, Corentin, ... Je vous souhaite à tous beaucoup de bonheur. Merci à mes trois stagiaires, Kylian, Hugo et Ruby, qui m'ont fait confiance et auprès desquels j'ai autant appris qu'eux. Kylian, je n'oublierai pas ta joie de vivre ni tes expressions rocamboliques, je suis très fière de ton parcours et te souhaite beaucoup de bonheur et de réussite. Merci à Anaïs, avec qui j'ai partagé de très bons moments scientifiques et personnels. Merci d'avoir tenu des cahiers de labo parfaits, ils m'ont beaucoup servi ! Je te souhaite beaucoup de réussite et de bonheur.

Je terminerai en remerciant chaleureusement toutes les personnes qui ont fait ou font partie de mon quotidien et qui ont contribué à mon épanouissement et à ma réussite.

Je remercie tou-te-s mes ami-e-s qui m'ont soutenue et ont toujours cru en moi. Mes ami-e-s du lycée, Emma, Coline, Yoann, Damien, Ludovic. Les copains et les copines de l'IUT, Jade, Emeline, Flory, Gwen, Pierre, Sabah, Salwa, Adrien. Les copines de l'IUT qui m'ont suivie dans l'aventure Edimbourg et avec qui j'ai passé une merveilleuse année (et de nombreuses soirées jeux et pancakes), Alix, Lulu et Ludivine, ma merveilleuse coloc/binôme/conseillère de vie. Je remercie aussi tou-te-s les collègues du Master, Marc, Tiphaine, Tiffany, Faustin, Nicolas, Maxime, Yohann, ... Je souhaite à tout le monde beaucoup de réussite.

Je remercie tous les membres de ma belle-famille. A mes beaux-parents Sylvie et Hervé : merci de toujours m'accueillir les bras ouverts, de bien me nourrir, de m'emmener en vacances (ou à l'aventure parfois) et de partager des moments de vie avec moi.

Merci à Roger, Denise et Michel pour votre accueil et votre soutien. Merci à Christian, Amandine et Sébastien pour tous les bons moments passés ensemble.

Je remercie finalement tous les membres de ma famille, mes tantes et oncles, mes cousines et cousins, et toutes les personnes qui m'ont vu grandir et ont grandi avec moi. Merci à mes taties et tontons pour les pauses café bien nécessaires tout au long de mes 8 années d'études. Merci à vous de toujours m'accompagner. Merci à mes grand-mères, Rosine et Rosine (eh oui) pour votre soutien, vos encouragements et votre amour.

A mon beau-frère Benjamin, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ton soutien. Merci pour tous nos débats, nos moments passés ensemble, nos évènements partagés. Merci au Bibou sauvage aussi s'il nous écoute, de loin par contre. Merci de prendre soin de ma sœur, et bon voyage à tous les deux où que vous alliez !

A mes parents, merci de m'avoir toujours soutenue et de m'avoir laissée faire mes propres choix. Chacune de mes décisions m'a semblé la bonne car vous n'avez jamais douté de ma réussite. Merci de croire en moi encore plus que moi-même. Merci de m'avoir accompagnée dans mes projets d'études, même au delà des frontières françaises. Merci de m'avoir soutenue financièrement et moralement pendant toutes ces années. Merci de me rassurer, de me donner de la sécurité, de me donner à manger et de réparer tous les trucs cassés dans mon appart. Merci d'être toujours présents, je vous aime.

Merci à ma sœur, la seule personne avec qui j'aie partagé autant d'heures de révision, et définitivement la seule personne qui m'aie fait apprendre autant de cours qui n'étaient pas les miens (donnez-moi ma première année de médecine svp). Merci d'avoir aiguisé mon esprit critique dès mon plus jeune âge, tu es la première à m'avoir donnée envie de faire de la science. Merci de toujours faire attention à moi et de prendre soin de moi. Merci de partager autant de moments si doux avec moi. Merci de me soigner et de soigner les gens qu'on aime. Tu as toujours été mon modèle. On est toutes les deux Docteurs maintenant, on peut être fières de nous. Je te souhaite le meilleur et je ne doute pas une seule seconde de ta réussite professionnelle et personnelle. J'espère que tu sauras t'épanouir là où tu le souhaites, je te soutiendrai dans toutes tes décisions. Je t'aime.

A Thomas, merci de partager mon quotidien. Merci d'être présent à mes côtés et de toujours me soutenir. Je suis infiniment reconnaissante d'avoir grandi avec toi, ces 7 dernières années. Je suis très fière du chemin qu'on a parcouru tous les deux. Merci pour ta gentillesse et ta bienveillance. Merci pour nos discussions interminables et pour nos silences. Je chéris tous ces souvenirs qu'on s'est créés pour la vie, entourés de nos proches et de notre chat Ramsès. Merci de prendre soin de moi et de toujours me rassurer. Merci de me faire confiance et de me soutenir dans tous mes projets. Tu mérites tout le bonheur du monde, je t'aimerai et te soutiendrai toujours peu importe les chemins que tu emprunteras. Partager ma vie avec toi me réjouit chaque jour.

Je réalise que j'ai probablement oublié de remercier beaucoup de personnes. Cette liste de remerciements n'est probablement pas exhaustive, ce qui me rend encore plus reconnaissante d'être entourée d'autant de personnes formidables.

# Sommaire

Abréviations .....	13
Préface .....	17
Exposé bibliographique .....	27
I. La bactérie <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	29
1) Caractéristiques du pneumocoque .....	29
1.1) Historique et découverte .....	29
1.2) Généralités sur le pneumocoque .....	29
1.3) Transformation naturelle et compétence .....	31
2) Importance et virulence .....	33
2.1) Données épidémiologiques .....	33
2.2) Facteurs de virulence .....	35
2.3) Vaccins et sérotypes .....	41
2.4) Antibiorésistance .....	43
II. La division cellulaire .....	49
1) Le divisome .....	49
1.1) L'anneau Z .....	51
1.2) Les autres composants du divisome .....	61
2) Régulation du divisome .....	67
2.1) Les systèmes de positionnement négatifs .....	69
2.2) Les systèmes de positionnement positifs .....	73
III. La paroi cellulaire .....	79
1) Composition de la paroi .....	79
1.1) Le peptidoglycane .....	79
1.2) Les acides téichoïques .....	83
2) Synthèse du peptidoglycane .....	85

2.1) Les SEDS .....	87
2.2) Les PBPs.....	87
2.3) Les régulateurs des PBPs .....	91
2.3) Les hydrolases .....	95
IV. La phosphorylation des protéines bactériennes .....	107
1) Les protéine-kinases bactériennes .....	109
1.1) Le système à deux composants .....	109
1.2) Le système phosphoénolpyruvate/sucre phosphotransférase.....	111
1.4) Les tyrosines protéine-kinases typiquement bactériennes .....	117
1.5) Les protéine-kinases atypiques .....	119
2) StkP, régulateur central de la division cellulaire du pneumocoque .....	123
2.1) Structure et fonction .....	123
2.2) Les substrats de StkP .....	125
Objectif des travaux .....	137
Matériel et méthodes .....	141
Résultats.....	158
Partie I – Rôle de la phosphorylation de la protéine MapZ dans la régulation de la division cellulaire chez <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	159
Partie II – Caractérisation de la protéine de morphogénèse CopD et rôle dans la division cellulaire de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	187
Discussion.....	217
Partie II – Caractérisation de la protéine de morphogénèse CopD et rôle dans la division cellulaire de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	233
Références bibliographiques .....	241
Annexes.....	265

## Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide nucléique

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine tri-phosphate

BSA : Bovine serum albumin – Albumine de sérum bovin

BLIP :  $\beta$ -lactamase inhibitor protein - Protéine inhibitrice de  $\beta$ -lactamase

BYK : Bacterial tyrosine kinase – Tyrosine kinase bactérienne

CBD : Choline binding domain – Domaine de liaison à la choline

CBP : Choline binding protein – Protéine de liaison à la choline

CHAP : Cysteine, histidine-dependent amidohydrolase/peptidase

CPS : Capsule polysaccharidique

CSP : Competence Stimulating Peptide – Peptide stimulant la compétence

CTD : C-terminal domain – Domaine C-terminal

C+Y : Milieu utilisé pour la culture de *S. pneumoniae*

Da : Dalton

DO : Densité optique

dSTORM : direct Stochastic optical reconstruction microscopy – Microscopie de reconstruction optique stochastique directe

FRAP : Fluorescence recovery after photobleaching – Redistribution de fluorescence après photoblanchiment

GTP : Guanosine triphosphate

GFP : Green fluorescent protein – Protéine fluorescente verte

HMW : High molecular weight – Haut poids moléculaire

HprK/P : Hpr kinase/phosphorylase

IDHK/P : Isocitrate déshydrogénase kinase/phosphorylase

$K_D$  : Constante de dissociation à l'équilibre

LB : Lysogeny broth – Bouillon lysogène

LBD : Lipid-binding domain – Domaine d'interaction aux lipides

LC-MS-MS : Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry – Spectrométrie de masse en tandem couplée à une chromatographie liquide

LMW : Low molecular weight – Bas poids moléculaire

MET : Microscopie électronique à transmission

MoRFs : Molecular recognition features – Motifs de reconnaissance moléculaires

MST : Microscale thermophoresis – Thermophorèse à micro-échelle

NAG : acide N-acétylglucosamine

NAM : acide N-acétylmuramique

NO : Nucleoid occlusion – Occlusion du nucléoïde

OMS : Organisation mondiale de la santé (WHO : World health organisation)

PASTA : Penicillin-binding protein and Serine/Threonine kinase-associated domain – Protéine de liaison à la pénicilline et domaine associé à la Sérine/Thréonine kinase

PBP : Penicillin-binding protein – Protéine de liaison à la pénicilline

PCR : Polymerase chain reaction – Réaction de polymérisation en chaîne

PEP : Phosphoénolpyruvate

PHP : Phosphoestérases histidinol phosphate

PPM : Protein phosphatase metal dependant – Protéine phosphatase dépendante des métaux

PPP : Phosphoprotein phosphatase – Phosphatase phosphoprotéine

PTM : Post-translational modifications – Modifications post-traductionnelles

PTS : Phosphotransferase system – Système phosphotransférase

SAXS : Small-angle X-ray scattering – Diffusion des rayons X aux petits angles

SEDS : Shape, Elongation, Division and Sporulation proteins – Protéines impliquées dans la forme, l'élongation, la division et la sporulation

SDS-PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium

SEM : Scanning electron microscopy – Microscopie électronique à balayage

SIM : Structured Illumination Microscopy – Microscopie à illumination structurée

SPR : Surface plasmon resonance – Résonance des plasmons de surface

STPK : Sérine/Thréonine protéine-kinase

TCS : Two-component system – Système à deux composants

TG : Transglycosylase

THY : Milieu Todd Hewitt Yeast extract – Milieu Todd Hewitt contenant de l'extrait de levure

TIRF : Total internal reflection fluorescence – Microscopie à ondes évanescentes

TnSeq : Transposon sequencing – Séquençage par insertion de transposons

TP : Transpeptidase

VPC : Vaccin pneumococcique conjugué

WT : Wild-type – Souche sauvage



# Préface

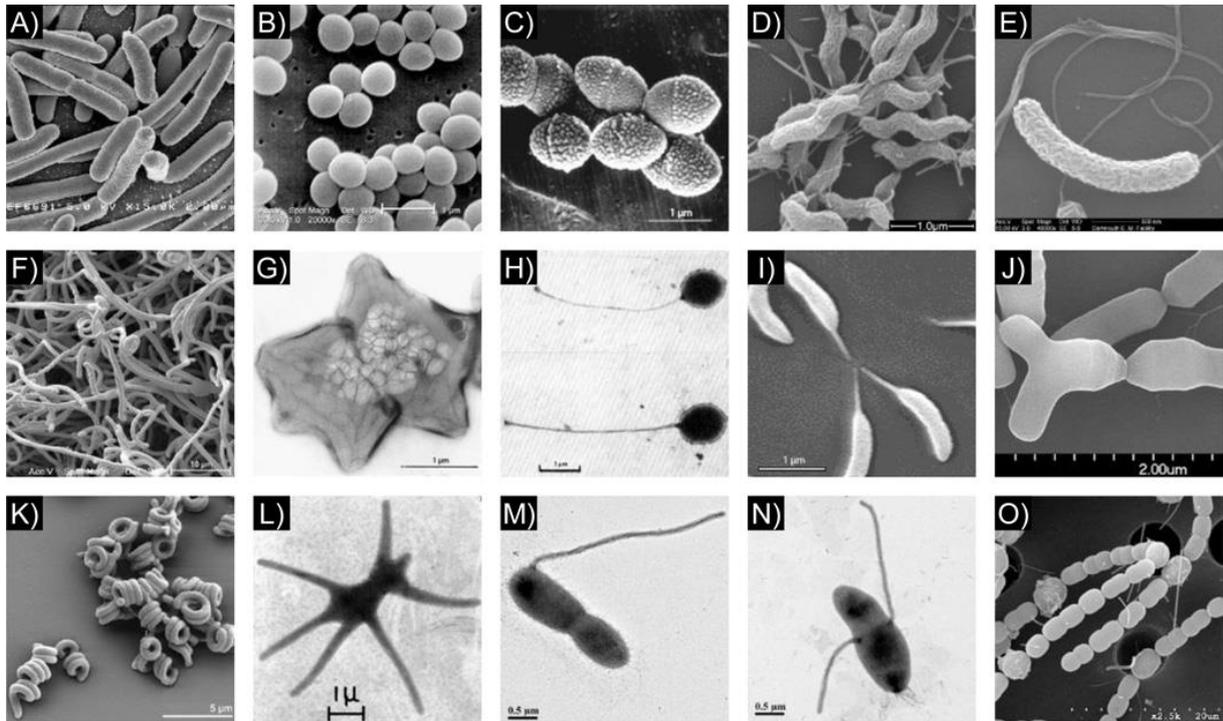


Figure 1 : Diversité de morphologies bactériennes : A) Bâtonnet, *Escherichia coli*. B) Sphère, *Staphylococcus aureus*. C) Ovocoque, *Streptococcus pneumoniae*. D) Spirale, *Campylobacter jejuni*. E) Croissant, *Vibrio cholerae*. F) Filaments branchés, *Streptomyces coelicolor*. G) Etoile, *Stella vacuolata*. H) Pédonculé, *Planctomyces maris*. I) Pédonculé et croissant, *Caulobacter crescentus*. J) Bifide/forme en Y, *Bifidobacterium breve*. K) Bobine, *Spirosoma linguale*. L) Nombreuses excroissances, *Ancalomicrobium adetum*. M) Pédonculé, *Asticcacaulis excentricus*. N) Pédonculé, *Asticcacaulis biprosthecum*. O) Chaînes et hétérocystes, *Anabaena variabilis*. (Jiang et al., 2015)

La majorité des bactéries possèdent une enveloppe cellulaire qui détermine leur volume, leur surface et leur forme. Les fluides composant leur cytoplasme exercent une force considérable sur la paroi cellulaire. Cette pression de turgescence varie de 3 atm pour *Escherichia coli* (Cayley et al., 2000) à 20 atm pour *Bacillus subtilis* (Whatmore and Reed, 1990, Rojas and Huang, 2018). En comparaison, la pression d'un pneu de vélo de course est d'environ 10 atm et celle d'une bouteille de champagne de 6 atm (Osawa and Erickson, 2018). Dans ce contexte, la synthèse de la paroi cellulaire s'avère essentielle pour préserver l'intégrité de la cellule. La paroi bactérienne est principalement composée de peptidoglycane, qui constitue un maillage fort et élastique pour assurer la résistance mécanique et la forme des cellules. Bien que de nombreuses bactéries adoptent une forme de sphère ou de bâtonnets, il existe une multitude d'autres formes ; spirales, étoiles, bobines, etc. (Figure 1).

Cette diversité n'est pas le résultat du hasard mais est le reflet d'une grande variété de fonctions biologiques et de niches environnementales auxquelles les bactéries se sont adaptées (Young, 2006). Les bactéries sont capables de coloniser de nombreux environnements tels que les sols, les eaux, les racines des plantes, les animaux, ainsi que des environnements extrêmes comme les lacs acides ou les sources chaudes ou encore des parties du corps autrefois considérées comme stériles, comme l'utérus ou le placenta (Peric et al., 2019 ; Shu and Huang, 2022). En outre, de nombreuses espèces bactériennes colonisent de manière courante le corps humain, incluant la peau et les intestins.

Ces espèces bactériennes qui colonisent le corps humain ont un impact significatif sur l'homéostasie de l'hôte. Elles ont un rôle clé dans la protection contre les pathogènes, la maturation du système immunitaire, la synthèse de vitamines (Peric et al., 2019). Lorsque l'équilibre de cet écosystème bactérien est perturbé, il peut se produire une dysbiose, favorisant l'émergence de bactéries opportunistes présentes à l'état physiologique dans un microbiote sain mais qui deviennent pathogène lors d'un déséquilibre. C'est le cas de *Streptococcus pneumoniae*, également connue sous le nom de pneumocoque, une bactérie opportuniste qui peut déclencher des infections pathogènes lors de dysbioses. En effet, le pneumocoque profite d'un système immunitaire non mature, affaibli ou altéré, infectant ainsi principalement les enfants de moins de deux ans, les patients immunodéprimés et les



personnes âgées (Infante et al., 2015). Les infections au pneumocoque causent la mort de 1,2 millions de personnes chaque année, en provoquant notamment des pneumonies, des méningites et des bactériémies (Troeger et al., 2018). Aujourd'hui, la meilleure protection contre la majorité des infections bactériennes est la prévention. Il existe des vaccins efficaces contre les sérotypes les plus fréquemment retrouvés dans les infections. Cependant, ces dernières années, on assiste à une augmentation des infections dues aux sérotypes non couverts par les vaccins (Subramanian et al., 2019).

À ce remplacement sérotypique s'ajoute l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques. En 2018, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a classé le pneumocoque parmi les pathogènes prioritaires contre lesquels il est urgent de trouver de nouvelles solutions thérapeutiques (OMS, 2017 ; Tacconelli et al., 2017). Récemment, la moitié des souches de *S. pneumoniae* isolées cliniquement ont été reportées comme résistantes à la pénicilline (Briles et al., 2019). Les infections bactériennes courantes gagnent en résistance face aux traitements, ce qui a déjà commencé à compliquer les traitements des méningites et menace d'augmenter la mortalité et la morbidité causées par les infections au pneumocoque si aucune autre mesure alternative n'est développée. La lutte contre l'émergence des souches antibiorésistantes est donc un enjeu majeur actuel et pour les années à venir.

L'étude du cycle cellulaire de *S. pneumoniae* figure parmi les stratégies adoptées pour restaurer la sensibilité des souches résistantes aux antibiotiques (OMS, 2023). Une meilleure compréhension de la régulation de la division cellulaire et de la synthèse de la paroi de la bactérie ouvre la voie à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et à l'exploration de nouvelles approches de traitement.

La division cellulaire est un processus essentiel et finement régulé ; il doit permettre de transmettre fidèlement les informations génétiques de la cellule mère à ses descendantes. Ainsi, une bactérie doit répliquer son génome, puis le répartir de manière équitable dans les deux cellules filles avant de se diviser et ainsi conduire à la séparation physique de ces dernières. Cette division cellulaire est indispensable pour garantir une descendance viable. Le pneumocoque se divise par fission binaire. A chaque cycle de division, la synthèse de la paroi cellulaire est assurée uniquement au centre de la cellule par un complexe multi-protéique, appelé le divisome (Goehring and Beckwith, 2005). Cette machinerie dynamique



est composée de différentes protéines permettant à la fois la constriction cellulaire et l'assemblage et le remodelage de la paroi cellulaire afin de générer deux cellules filles identiques. Dans ce contexte, le placement de la machinerie de division au centre de la cellule est essentiel au maintien d'une taille et d'une morphologie constante au fil des générations. Contrairement à d'autres bactéries modèles telles que *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, le pneumocoque met en œuvre un mécanisme unique de positionnement du divisome, faisant intervenir la protéine MapZ (Fleurie et al., 2014). Cette dernière joue un rôle crucial en guidant le positionnement de la machinerie de division au centre de la cellule. Une fois positionnée, il est essentiel de réguler le fonctionnement de cette machinerie pour permettre les réactions ultérieures nécessaires à la formation des deux cellules filles. Il a ainsi été démontré que des modifications post-traductionnelles, et plus particulièrement la phosphorylation, ont un rôle central dans l'assemblage et le fonctionnement de la machinerie de division. En effet, la sérine-thréonine protéine-kinase StkP a été identifiée comme le régulateur global du cycle cellulaire du pneumocoque, et elle phosphoryle notamment MapZ (Fleurie et al., 2014). Bien que l'équilibre entre les formes phosphorylées et non phosphorylées de MapZ soit essentiel pour la formation et la constriction de la cellule, le rôle précis de la phosphorylation de MapZ et les mécanismes moléculaires associés restent encore inconnus.

Au sein du divisome, la biosynthèse et l'assemblage de la paroi cellulaire sont finement régulés par un ensemble de protéines parmi lesquelles les protéines de la famille des Penicillin-Binding Proteins (PBPs). Ces protéines sont essentielles à l'assemblage du composé majeur de la paroi cellulaire, le peptidoglycane, un polymère de sucre réticulé par des ponts interpeptidiques indispensable aux propriétés mécaniques de la paroi cellulaire. L'activité de ces enzymes est contrôlée par des protéines régulatrices qui sont impliquées dans l'activation ou la localisation des PBPs qu'elles régulent (Fenton et al., 2016 ; Fenton et al., 2018).

Mes travaux de thèse se sont concentrés sur deux axes de recherche. Dans un premier temps, nous avons étudié le rôle de la phosphorylation de la protéine MapZ dans la régulation de la division cellulaire. J'ai ainsi montré que MapZ interagit avec EzcA, une protéine essentielle du divisome, et que leur interaction est modulée par l'état de phosphorylation de MapZ, ce qui contribue à stabiliser la machinerie de division au centre de



la cellule. D'autre part, j'ai identifié une nouvelle protéine de régulation des PBPs, nommée CopD. Nous avons montré que CopD est une protéine de morphogénèse du pneumocoque qui interagit spécifiquement avec les PBPs PBP1a et PBP2b et qui joue un rôle clé dans leur dynamique spatio-temporelle.

Avant de décrire en détail mes travaux, je présenterai la bactérie *Streptococcus pneumoniae*, ainsi que l'état actuel des connaissances concernant son cycle cellulaire. Certains mécanismes étant encore peu décrits chez le pneumocoque, je m'appuierai sur les connaissances obtenues chez d'autres bactéries modèles comme *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis* quand cela sera nécessaire. Je détaillerai ensuite la composition de la paroi cellulaire du pneumocoque et les éléments impliqués dans son processus de synthèse. Enfin, dans une dernière partie, j'aborderai l'état des connaissances acquises sur les protéine-kinases bactériennes ainsi que leurs rôles dans le cycle cellulaire.



# Exposé bibliographique

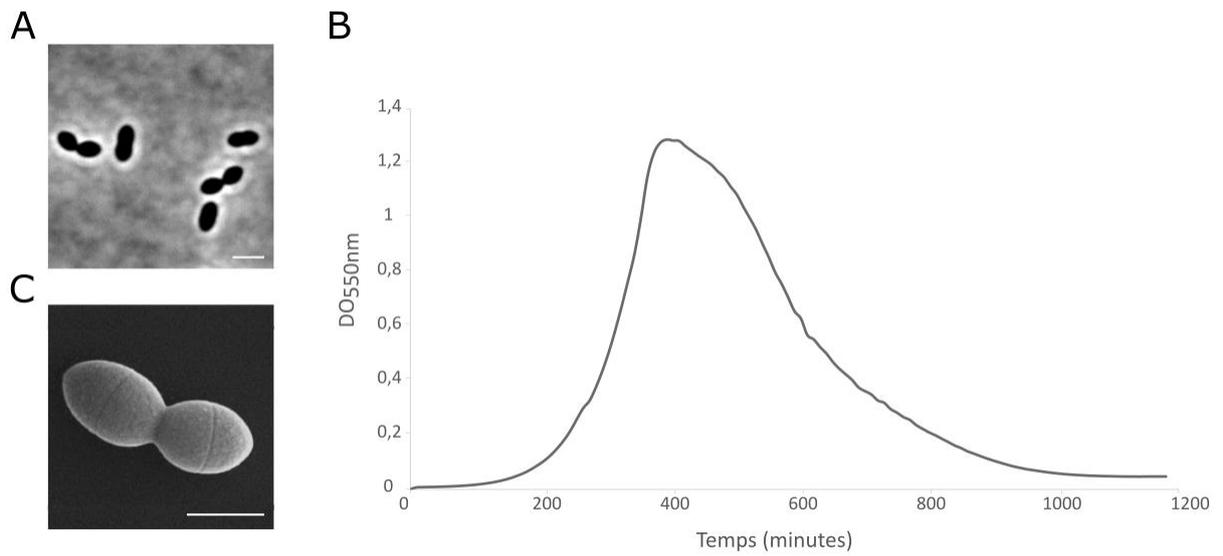


Figure 2 : *Streptococcus pneumoniae*. A) Microscopie optique à contraste de phase de cellules wild type. Barre d'échelle : 2  $\mu\text{m}$ . B) Courbe de croissance d'une souche wild type. *S. pneumoniae* montre une phase de latence précédant une croissance exponentielle et une lyse à une  $\text{DO}_{550\text{nm}} \approx 1,0-1,4$ . C) Image de microscopie électronique à balayage. Barre d'échelle : 1  $\mu\text{m}$ .

## I. La bactérie *Streptococcus pneumoniae*

### 1) Caractéristiques du pneumocoque

#### 1.1) Historique et découverte

Le pneumocoque a été découvert en 1881 de manière indépendante par deux chercheurs, le Français Louis Pasteur et l'américain George Sternberg, dans le cadre de leurs études respectives sur la rage et la malaria (Pasteur, 1881 ; Sternberg, 1881). Les deux microbiologistes ont observé des bactéries « à forme de lancette » dans la salive humaine. Ils ont ensuite injecté cette salive à des lapins et ont pu isoler l'agent responsable de leur mort. Pasteur le décrit ainsi : "Un bâtonnet extrêmement court, un peu déprimé vers son milieu, une forme de 8 par conséquent, dont le diamètre de chaque moitié ne dépasse pas souvent un demi millième de millimètre" (Pasteur, 1881). Ce microorganisme a été initialement appelé "microorganisme de la pneumonie" par Carl Freidländer, puis il a été renommé pneumocoque en 1886 par Albert Fränkel (Feikin, et al., 2017). En 1920, il a été rebaptisé *Diplococcus pneumoniae* en raison de sa forme en paire, puis il a été renommé *Streptococcus pneumoniae* en 1974 en raison de sa capacité à former des chaînes similaires aux Streptococci.

#### 1.2) Généralités sur le pneumocoque

*Streptococcus pneumoniae* fait partie de la division des Firmicutes, de la classe des Bacilli, de l'ordre des Lactobacillales et de la famille des Streptococcaceae. C'est une bactérie monoderme, à Gram positif, la plupart du temps extracellulaire mais qui peut également adopter un mode de vie intracellulaire en cas d'infections invasives (Ercoli et al., 2018 ; Subramanian et al., 2019). Elle a une forme de cocci légèrement allongée de 0.5µm de diamètre, qui sont assemblés par paire (Figure 2AC). Elle est commensale des voies respiratoires, colonisant le nasopharynx de 10% des adultes et 65% des enfants (Abdullalhi et al., 2012, Yahiaoui et al., 2016).

Le pneumocoque se cultive en laboratoire, sur gélose et en milieu liquide. C'est une bactérie anaérobie aérotoleante. Sur gélose supplémentée de sang défibriné, on voit apparaître une plage de lyse claire autour de la colonie, résultat de la beta-hémolyse du sang. Un halo vert entoure la plage de lyse, correspondant à la lyse partielle des globules rouges, appelée alpha-hémolyse (Lorian and Papoola, 1972).

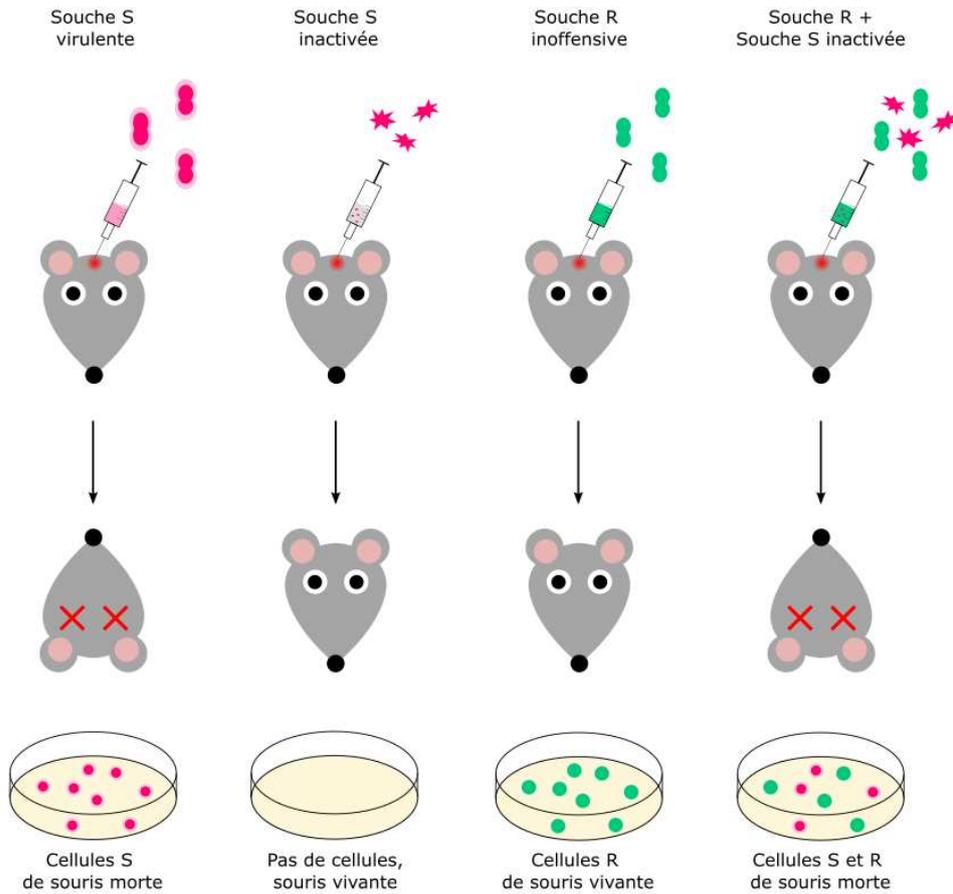


Figure 3 : Expérience de Griffith mettant en évidence les propriétés antigéniques de la capsule. L'injection d'une souche virulente S (en rose) entraîne la mort de la souris contrairement à l'injection de la même souche inactivée par la chaleur ou d'une souche non virulente R (en vert). L'injection de la souche non virulente et de la souche capsulée tuée par la chaleur conduit à la mort de la souris. Les bactéries provenant du sang des souris mortes ou vivantes peuvent être à nouveau cultivées sur gélose. Adapté de (Griffith, 1928).

La croissance du pneumocoque est caractérisée par une phase exponentielle, au cours de laquelle on voit apparaître un bref arrêt de croissance correspondant à la mise en place de la compétence (voir chapitre I.1.3) puis suivie d'une phase de lyse (Figure 2B). Cette lyse cellulaire est le résultat de la libération dans le milieu extracellulaire de la protéine LytA, une autolysine qui est également un facteur de virulence majeur de la bactérie (voir chapitre I.2.1).

### 1.3) Transformation naturelle et compétence

A partir du XX<sup>e</sup> siècle, le pneumocoque a été utilisé comme modèle dans de nombreuses expériences scientifiques et notamment lors d'une expérience visant à démontrer la transformation génétique des bactéries. Le pneumocoque est naturellement compétent, c'est à dire qu'il peut intégrer de l'ADN exogène de son environnement à son propre génome, par recombinaison homologe. C'est cet état de compétence qui confère au pneumocoque son incroyable plasticité génomique, lui permettant entre autres de modifier ses antigènes capsulaires pour échapper au système immunitaire (voir chapitre I.2.3). En 1928, l'expérience de Frederick Griffith est la première à démontrer que les bactéries sont capables d'intégrer de l'information génétique (Figure 3). Griffith a comparé le pouvoir infectieux d'une souche de *S. pneumoniae* capsulée, nommée « S » (pour Smooth, lisse en anglais) avec celui d'une souche non capsulée, nommée « R » (pour Rough, rugueuse). Il a injecté ces différentes souches à des souris selon les conditions suivantes : (i) la souche « S », virulente (ii) la souche « R », inoffensive (iii) la souche « S » inactivée par la chaleur, perdant ainsi son pouvoir infectieux et enfin (iv) un mélange de la souche « S » inactivée par la chaleur avec la souche « R » vivante. Ce dernier mélange a entraîné la mort des souris. Griffith parvient à isoler des bactéries « S » à partir du sang des souris tuées par ce mélange. Il a donc conclu que les bactéries « R » s'étaient *transformées* en bactéries « S » grâce à l'incorporation d'une information, et appelle ça le principe transformant. En 1944, Avery, MacLeod et McCarty ont démontré que le facteur transformant était de l'ADN.

La transformation naturelle est un mécanisme de transfert horizontal de gènes qui se produit grâce à des gènes spécifiques appelés gènes de compétence. La compétence est régulée par un processus appelé quorum sensing. Lors de la phase de croissance, les bactéries libèrent un auto-inducteur, le CSP (Peptide stimulant la compétence) (Håvarstein

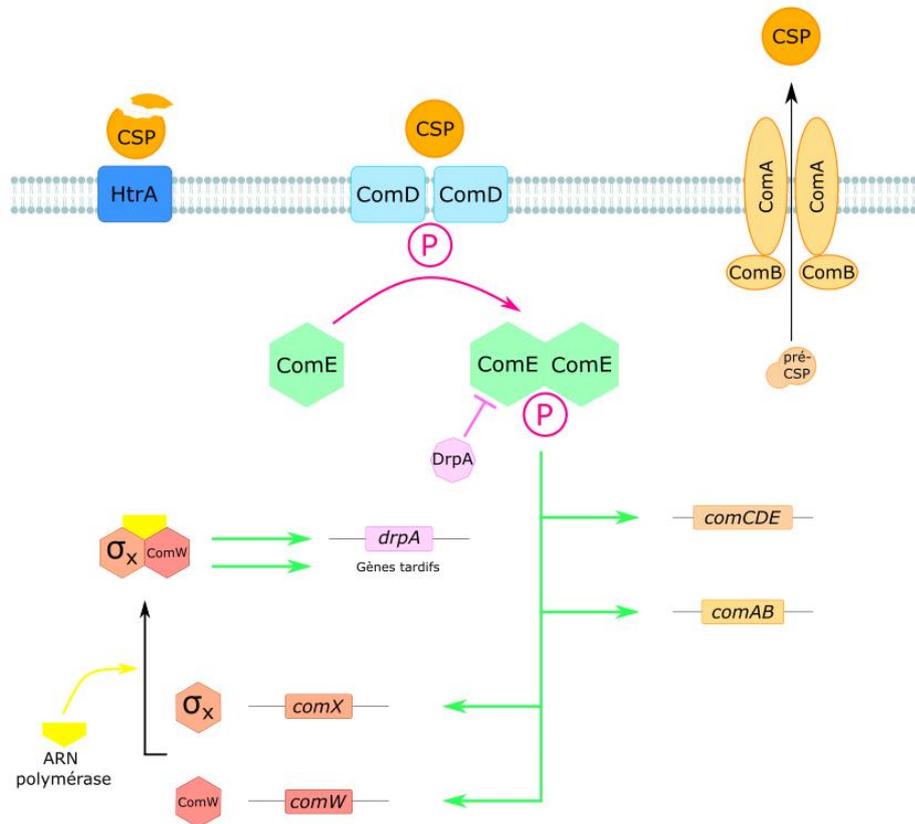


Figure 4 : La compétence chez *S. pneumoniae*. La compétence est induite par l'accumulation de CSP (orange), d'abord synthétisé comme précurseur (pré-CSP) par ComC. Il est mûri puis exporté par le transporteur ABC ComAB (orange clair). Le CSP extracellulaire se fixe sur le système à deux composants ComDE (bleu et vert). Cela induit la phosphorylation de ComE (P rose), qui active la transcription des opérons *comAB* et *comCDE*, établissant une boucle de rétrocontrôle positive. Le gène *comX* code pour le facteur alternatif sigma X ( $\sigma_X$ ) spécifique de la compétence. Il nécessite la protéine ComW pour améliorer son interaction avec l'ARN polymérase (jaune). Ce mécanisme n'étant pas encore décrit, le schéma est simplifié et montre un complexe d'interaction entre  $\sigma_X$ , l'ARN polymérase et ComW.  $\sigma_X$  contrôle l'activation de nombreux gènes tardifs de la compétence et du gène codant pour DrpA (rose), une protéine impliquée dans l'arrêt de la compétence en séquestrant ComE phosphorylé. L'arrêt de la compétence implique aussi ComE, qui inhibe la transcription de *comCDE* par compétition d'interaction avec ComC phosphorylé. La protéine HtrA (bleu foncé) dégrade le CSP extracellulaire. Les flèches vertes représentent l'activation de l'expression des gènes, la ligne rose représente l'inhibition de la réaction. Adapté de (Weyder et al., 2018).

et al., 1995). Lorsque la densité bactérienne atteint un seuil critique, la concentration en auto-inducteur devient suffisante pour déclencher l'expression des gènes impliqués dans la phase précoce de la compétence (Figure 4). A ce stade, le CSP se lie à la protéine réceptrice ComD, un récepteur histidine kinase (Johnsborg & Håvarstein, 2009). Cette liaison provoque l'autophosphorylation de ComD, qui phosphoryle à son tour le régulateur de réponse cytosolique ComE. ComE activé se lie à l'ADN et induit la transcription des gènes ComX, ComAB et ComCD, ainsi que de lui-même (ComE) (Johnsborg & Håvarstein, 2009). En activant la transcription du gène ComC (qui code pour le CSP) et de ComE, une boucle de rétroaction positive se forme, garantissant que toutes les bactéries deviennent compétentes. Le gène *comX* code pour le facteur alternatif sigma X ( $\sigma_X$ ) spécifique de la compétence. ComX est le régulateur des gènes tardifs de la compétence. Il active la RNAP (ARN polymérase) qui permet la transcription des gènes tardifs nécessaires à l'absorption et à l'intégration de l'ADN. On estime qu'il existe plus de 80 gènes tardifs, dont 14 sont décrits comme essentiels à la compétence (Johnsborg & Håvarstein, 2009). La fonction de ComAB est d'exporter et de cliver ComC pour produire du CSP actif. La fermeture de la compétence est régulée par deux protéines, DprA et la protéase HtrA (Cassone et al., 2012 ; Mirouze et al., 2013 ; Weng et al., 2013 ; Weyder et al., 2018). DrpA est impliquée dans l'arrêt de la compétence en séquestrant la protéine ComE phosphorylée. HtrA est responsable de la dégradation du CSP extracellulaire.

## 2) Importance et virulence

*Streptococcus pneumoniae* colonise la muqueuse de l'appareil respiratoire supérieur. Cette étape de colonisation est indispensable à sa transmission à d'autres individus et à son invasion dans l'hôte infecté (Figure 5A). Dans cette partie, je présenterai les facteurs de virulence du pneumocoque ainsi que les différents traitements actuellement disponibles et ceux envisagés pour l'avenir.

### 2.1) Données épidémiologiques

Les infections des voies respiratoires inférieures représentent un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Dans les pays à revenus intermédiaires et élevés, ces infections sont les seules maladies transmissibles à figurer parmi les 10 causes principales de

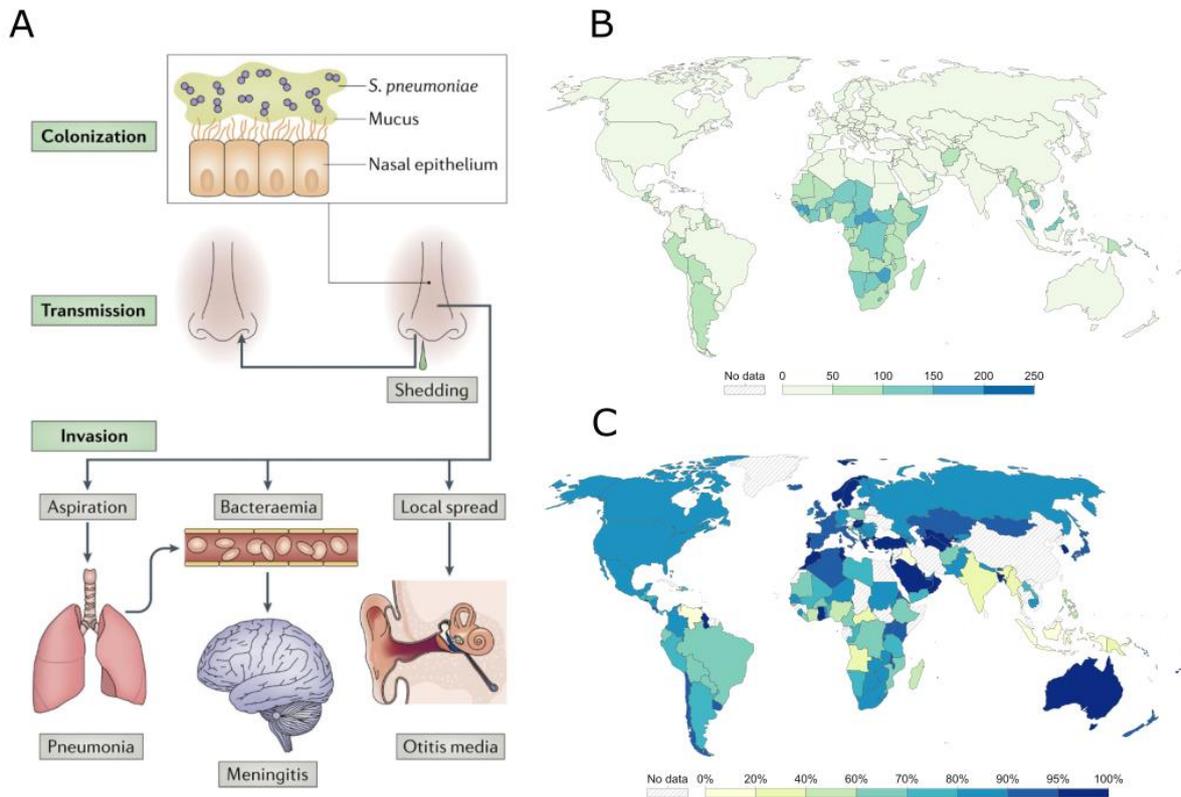


Figure 5 : Infections et épidémies. A) Colonisation par le pneumocoque. Le pneumocoque colonise le mucus des voies respiratoires supérieures puis se transmet par aérosols et écoulements nasaux. Il peut coloniser les poumons, le sang et même traverser la barrière hémato-encéphalique pour causer des méningites (Weiser et al., 2018). B) Taux de mortalité des pneumonies pour 100 000 personnes, en 2019. Cas de pneumonies cliniques diagnostiquées sur la base de symptômes (toux, difficultés respiratoires). Source : IHME, global burden of disease, 2019. C) Enfants de moins de 1 an qui ont reçu un programme de vaccination complet du PCV (soit 3 doses), en 2021 (Unicef, 2022). Les cartes sont issues de ourworldindata.org/pneumonia (Dardonaite & Roser, 2019).

mortalité (OMS). Ces infections comprennent les pneumonies et les bronchiolites, qui ont tué 2,6 millions de personnes en 2019 selon l'OMS (OMS, 2019) (Figure 5B). La principale cause de ces infections est *Streptococcus pneumoniae*, responsable de la mort de 1.2 millions de personnes chaque année (Troeger et al., 2018). Ces infections peuvent survenir en milieu hospitalier ou extrahospitalier (pneumonies communautaires). Les pneumonies communautaires sont les plus courantes et constituent la principale cause de décès chez les enfants de moins de cinq ans, entraînant la mort d'un enfant toutes les 39 secondes, selon l'UNICEF (UNICEF, 2019). Ces infections se transmettent par voie aérienne, mais le pneumocoque peut aussi passer les barrières épithéliales et endothéliales pour atteindre le sang et les organes et provoquer des infections invasives (Brown et al., 2014 ; Feldman et al., 2018). En passant la barrière hémato-encéphalique, il provoque des méningites. Létales dans 18 à 30% des cas, elles entraînent des séquelles, telles que la perte d'audition et des problèmes cognitifs dans 50% des cas (Saez-Llorens & McCracken, 2003 ; van de Beek et al., 2006 ; Weisfelt et al., 2006). Pendant longtemps considéré comme un pathogène extracellulaire, de récentes études montrent qu'une phase intracellulaire est cruciale pour créer des infections invasives telles que des bactériémies (Brissac et al., 2018). Le pneumocoque peut ainsi créer des niches intracellulaires dans le cœur, la rate, le cerveau, les poumons, qui servent de réservoir pour la recolonisation (Subramanian et al., 2019). Les infections à pneumocoque peuvent également survenir à la suite d'une infection virale car les dommages causés à l'épithélium du tractus respiratoire facilitent la colonisation bactérienne et favorisent ainsi les co-infections (Nakamura et al., 2011 ; McCullers, 2014). Lors de la pandémie de grippe de 1918 par exemple, l'examen des poumons de patients décédés a révélé que la plupart des décès avaient été causés par des co-infections bactériennes, principalement par *S. pneumoniae*, plutôt que par le virus lui-même (Klein et al., 2016 ; Khan et al., 2017).

## 2.2) Facteurs de virulence

Les trois étapes clés de la pathogénie du pneumocoque sont la transmission, la colonisation et l'invasion (Figure 5A). Chacune de ces étapes nécessite l'action de facteurs de virulence, qui permettent à la bactérie de s'adhérer aux tissus, d'échapper au système immunitaire et



de se propager (Brooks and Mias, 2018). Les facteurs de virulence majeurs du pneumocoque sont présentés ci-dessous.

- **La capsule polysaccharidique**

La capsule polysaccharidique est l'un des principaux facteurs de virulence du pneumocoque. C'est une structure externe composée de polymères de sucre qui enveloppe la paroi cellulaire. Il existe plus de 97 sérotypes différents de *Streptococcus pneumoniae*, identifiés en fonction de leur composition en polysaccharides capsulaires distincts (Geno et al., 2015). La capsule permet aux bactéries de masquer leurs antigènes protéiques, ce qui leur permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte. La capsule, composée d'acides polysaccharidiques et de phosphates, a une charge négative, ce qui crée une répulsion électrostatique avec le mucus et les cellules phagocytaires, comme les macrophages, empêchant ainsi l'élimination du pathogène (Dockrell and Brown, 2015). De plus, la capsule polysaccharidique joue un rôle dans la résistance aux mécanismes de destruction de l'immunité innée, tels que le système du complément (Kim et al., 1999).

L'épaisseur de la capsule peut varier en fonction de l'étape d'infection, c'est ce qu'on appelle la variation de phase. Elle peut en effet être très fine, voire transparente, au moment de l'adhésion aux cellules épithéliales et devenir opaque et épaisse lors de la colonisation pour éviter l'emprisonnement dans le mucus, ce qui lui permet d'échapper au système immunitaire et à la phagocytose (Weiser et al., 1994 ; Mook-Kanamori et al., 2011 ; Haoran et al., 2022).

Pour survivre, la bactérie peut également modifier la composition de sa capsule polysaccharidique. Pour cela, elle peut intégrer de l'ADN exogène d'un autre pneumocoque codant pour des gènes capsulaire, par recombinaison homologue. Ce phénomène permet de résister à la pression de sélection des antibiotiques et des vaccins (voir chapitre I.2.3).

- **La pneumolysine**

La pneumolysine est une protéine cytoplasmique libérée pendant la lyse des cellules. C'est une autolysine qui agit en formant des pores dans les membranes des cellules cibles (Morgan et al., 1995 ; Kadioglu et al., 2008). Cela entraîne la fuite d'ions et de petites molécules à travers la membrane cellulaire, ce qui perturbe l'équilibre osmotique et conduit



à la mort des cellules. Elle cible les cellules eucaryotes, dont la membrane contient du cholestérol, comme les globules rouges, l'épithélium du poumon ou les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (Palmer, 2001). La présence de la pneumolysine dans les voies respiratoires peut causer des dommages aux cellules pulmonaires, entraînant une inflammation et des lésions tissulaires. De plus, les lésions endothéliales facilitent l'invasion du pneumocoque dans le sang et sa dissémination vers d'autres organes (Zafar et al., 2018).

La pneumolysine peut également activer les cellules immunitaires, comme les macrophages, les neutrophiles et induire la production de cytokines inflammatoires (Jedrezejak et al., 2001 ; Hirst et al., 2004).

- LytA

La protéine LytA, également appelée autolysine A, joue un rôle essentiel dans le processus d'autolyse. En effet, la lyse cellulaire permet la libération du contenu cytoplasmique, dont des facteurs de virulence, pour promouvoir la colonisation et échapper au système immunitaire (Kadioglu et al., 2008). La structure de LytA présente deux domaines fonctionnels distincts. Au niveau de son domaine N-terminal, LytA possède une amidase qui est responsable de l'hydrolyse des liaisons peptidoglycanes et provoque ainsi la lyse des cellules bactériennes (Mellroth et al., 2012). LytA joue également un rôle dans l'adhésion bactérienne à l'épithélium et l'activité hémolytique du pneumocoque (Vilhena et al., 2022).

Ces facteurs de virulence ne représentent qu'une partie des mécanismes utilisés par le pneumocoque pour causer des infections. En effet d'autres facteurs de virulence contribuent à sa pathogénicité, tels que les choline binding proteins (CBPs), les adhésines, les facteurs de régulation génétique ou encore la capacité du pneumocoque à former des biofilms (Brooks and Mias, 2018). Comprendre ces mécanismes de virulence est crucial pour le développement de stratégies préventives et thérapeutiques efficaces contre les infections à pneumocoque.



### 2.3) Vaccins et sérotypes

Plus de 97 sérotypes de *S. pneumoniae* ont été identifiés à ce jour (Geno et al., 2015), distingués par leurs variations dans les polysaccharides capsulaires, tous reconnus de manière indépendante par l'hôte (Brooks and Mias, 2018).

C'est en 1933 qu'on découvre le potentiel vaccinogène des polysaccharides capsulaires (Avery and Goebel, 1933 ; Walther et al., 1939). Dans les années 1940, les polysaccharides sont utilisés par les militaires et dans les maisons de soin. Le premier traitement vaccinal a été mis en œuvre et dirigé contre plusieurs sérotypes de la capsule en 1945 (Macleod et al., 1945). Néanmoins, l'utilisation des vaccins fut délaissée après le succès des antibiotiques à cette époque (Mäkelä & Butler, 2014). L'utilisation massive de la pénicilline à la période de la seconde guerre mondiale a conduit à l'émergence de souches résistantes aux pénicillines, contre lesquelles il faut lutter désormais avec d'autres antibiotiques. De plus, la morbidité et la mortalité des infections à pneumocoque reste très élevée car l'utilisation des antibiotiques n'est souvent pas suffisante. En effet, la rapidité avec laquelle la maladie peut progresser vers des complications graves peut dépasser l'efficacité des antibiotiques. L'émergence de souches résistantes à la pénicilline et l'inefficacité des antibiotiques mettent en évidence l'importance de traitements préventifs.

Un premier vaccin préventif a été développé en 1977, le vaccin antipneumococcique polysaccharidique (PPV) qui luttait contre un nombre limité de sérotypes (Siber, 1994). Ce vaccin contenait des polysaccharides provenant de différentes souches de pneumocoques et était destiné aux adultes et aux enfants de plus de deux ans. Cependant, chez les jeunes enfants, la réponse immunitaire aux polysaccharides capsulaires est limitée en raison de l'immaturité du système immunitaire. C'est pourquoi les vaccins conjugués, qui lient les polysaccharides capsulaires à des protéines antigènes pour améliorer leur immunogénicité, sont utilisés pour protéger les nourrissons et les jeunes enfants contre les infections à pneumocoques. Le premier vaccin antipneumococcique polysaccharidique conjugué heptavalent (PCV7) a été autorisé en 2000. Il a considérablement renforcé la protection contre de nombreux variants, y compris certains qui sont résistants à la pénicilline. Cependant, on a rapidement observé une augmentation des infections causées par des sérotypes non inclus dans le vaccin, ce phénomène est appelé le remplacement sérotypique. Pour faire face à ce problème, le PCV13 a été introduit en 2010. Il protège contre 13 souches



de pneumocoques et est utilisé chez les nourrissons, les enfants et les adultes. Ce vaccin a été efficace pour réduire les infections invasives à pneumocoque et a remplacé le PCV7 dans de nombreux pays. Aujourd'hui, la majorité des enfants dans les pays développés sont vaccinés au PCV13, ce qui offre une protection contre les sérotypes les plus fréquents et a conduit à une réduction significative des infections invasives à pneumocoque chez les enfants (Figure 5C). Cependant, le phénomène de remplacement sérotypique continue et en Europe, deux ans après l'implémentation du VPC13, 72% des infections étaient dues à des sérotypes non inclus dans les vaccins (Levy et al., 2014 ; Gladstone et al., 2015 ; Subramanian et al., 2019). De nouveaux vaccins ont été développés pour ajouter une protection contre les sérotypes émergents. C'est le cas du PCV-20, qui protège contre les variants responsables de méningites et contre des variants antibiorésistants. En France, le calendrier de vaccination recommande le VPC13 puis éventuellement le vaccin non conjugué VPP23 pour les personnes à risque et selon l'historique de vaccination (HAS, 2023).

Avec plus de 97 sérotypes connus, ajouter une protection contre d'autres variants responsables d'infections semble être une stratégie longue et coûteuse et ne semble pas adaptée à l'utilisation dans les pays émergents où les infections sont majoritaires. De plus, la distribution des sérotypes causant les infections varie selon la zone géographique et les effets du remplacement des sérotypes sur la santé publique varie dans le monde (Subramanian et al., 2019).

Le nouvel enjeu est donc de trouver des solutions thérapeutiques pour les sérotypes non inclus dans les vaccins et les souches non capsulées. Des nouvelles stratégies vaccinales consistent à utiliser (i) des vaccins avec des protéines recombinantes (ii) des protéines recombinantes combinées aux PCVs et (iii) des vaccins à germe entier atténué et non encapsulé, sur lesquels seraient exposés des protéines de surface immunogènes. Un exemple de ce dernier type de vaccin est celui dérivé de la souche non proliférante et non capsulée *RM200 RXIE Pdt ΔlytA*, dans laquelle les gènes codant pour l'autolysine LytA et pour la pneumolysine Ply ont été délétés et inactivés, respectivement (Keech et al., 2020).

#### 2.4) Antibiorésistance

Les antibiotiques généralement utilisés en première intention pour combattre les infections au pneumocoque sont des  $\beta$ -lactamines et des macrolides. Le traitement dépend du profil



de résistance et peut reposer sur l'utilisation de fluoroquinolones, de pleuromutiline et parfois de vancomycine lorsque les antibiotiques de première intention sont inefficaces (Larry M. Bush, 2021).

Les  $\beta$ -lactamines agissent en imitant le substrat des Penicillin-binding proteins (PBP), ce qui entraîne une inhibition compétitive de leur activité et conduit à la suppression de la croissance bactérienne ou à la lyse cellulaire (Tipper & Strominger, 1965). La modification des PBPs est un des principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques chez le pneumocoque. Ces modifications incluent des mutations ponctuelles et des mutations mosaïques. Les PBPs mosaïques sont le résultat de la recombinaison génétique entre différents gènes de PBP provenant de souches de pneumocoques résistantes et sensibles aux pénicillines. Cela entraîne l'apparition de PBPs ayant des propriétés mixtes, combinant des régions de séquences génétiques provenant de différentes souches. Cela confère à la PBP une modification structurale qui réduit sa capacité à se lier aux  $\beta$ -lactames, notamment aux pénicillines. Les modifications les plus fréquentes se trouvent dans les PBPs de classe B PBP2b et PBP2x et, pour les souches les plus résistantes, dans la PBP de classe A PBP1a (Barcus et al., 1995 ; Chesnel et al., 2005 ; Zapun et al., 2008a ; Hakenbeck et al., 2012).

Le pneumocoque a également développé une résistance aux macrolides, une classe d'antibiotiques qui inhibe la synthèse des protéines en se liant aux sous-unités ribosomales 23S et 50S (Haenni et al., 2018). Son mécanisme de résistance repose sur la méthylation d'une adénine de l'ADN ribosomal de la sous-unité 50S du ribosome, ce qui diminue l'affinité des macrolides pour le ribosome (Klugman & Lonks, 2005). D'autre part, il peut exprimer le gène *mefA* qui code pour une pompe à efflux, permettant ainsi l'élimination des macrolides de la cellule bactérienne (Leclercq & Courvalin, 2002).

Bien que des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension des maladies pneumococques au cours des trois dernières décennies, ces infections demeurent un problème de santé majeur. L'utilisation de vaccins conjugués a permis de réduire considérablement le nombre de cas de pneumonies et de méningites mortelles au cours des vingt dernières années. Néanmoins, en raison du remplacement sérotypique et de la résistance aux antibiotiques, les traitements actuels peuvent être inefficaces (Brooks and Mias, 2018). Par conséquent, il est essentiel de poursuivre les recherches afin d'améliorer



l'efficacité des traitements préventifs et de trouver des solutions pour faire face aux souches résistantes aux antibiotiques.

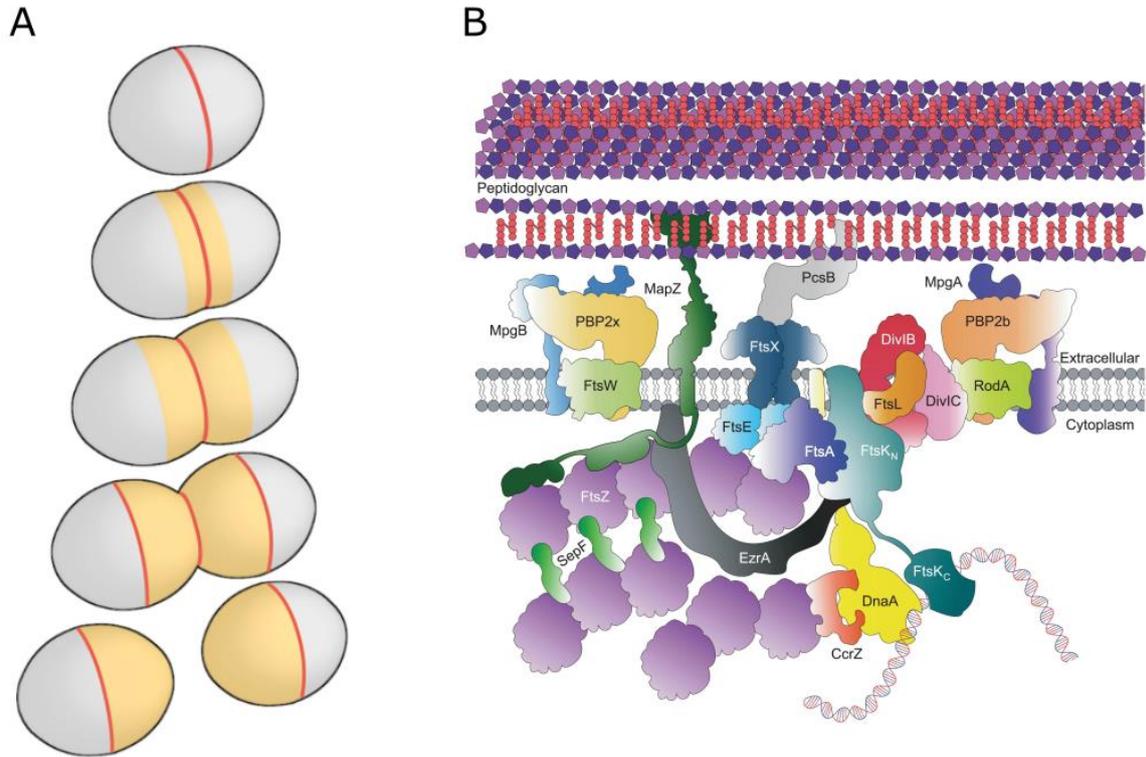


Figure 6 : Division cellulaire de *S. pneumoniae*. A) Le divisome (en rouge) est un complexe protéique formé au centre de la cellule. La bactérie se divise au centre de la cellule pour donner naissance à deux cellules filles héritant d'un ancien pôle issu de la cellule mère (en gris) et d'un nouveau pôle (en jaune). B) Schéma représentant les acteurs principaux de la division cellulaire aux équateurs des cellules en division (Briggs et al., 2021). Pour simplifier le modèle, les PBPs de classe A (PBP1a, PBP1b et PBP2a) et les hydrolases de la paroi cellulaire ne sont pas représentées.

## II. La division cellulaire

### 1) Le divisome

Pendant la division cellulaire, une coordination spatiale et temporelle est nécessaire pour assurer la réplication fidèle du chromosome bactérien, la ségrégation des chromosomes et la synthèse de la paroi cellulaire. Ces processus sont essentiels pour générer deux cellules filles viables, présentant une taille et une forme identiques (Haeusser & Levin, 2008).

La division cellulaire implique une série de processus complexes et coordonnés assurés par différentes protéines qui interagissent entre elles et forment une machinerie dynamique appelée le divisome (Goehring & Beckwith, 2005 ; Briggs et al., 2021) (Figure 6B). Cette machinerie est responsable de la synthèse de la paroi permettant la séparation entre les cellules filles (synthèse septale) et la synthèse permettant l'élongation de la cellule mère (synthèse latérale, polaire ou périphérique suivant l'espèce considérée).

Bien que de nombreuses protéines soient très conservées entre les différentes espèces bactériennes, certaines sont spécifiques à chaque espèce ou peuvent avoir des rôles différents. Je décrirai dans cette partie les protéines importantes pour la division cellulaire du pneumocoque, en les comparant lorsque nécessaire à des bactéries modèles comme *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*.

Comme la plupart des bactéries de forme ellipsoïde, le pneumocoque synthétise sa paroi cellulaire (septale et périphérique) uniquement au centre de la cellule (Daniel & Errington, 2003 ; Ng et al., 2004). Les nouveaux hémisphères des cellules filles se forment ainsi entre les deux anciens hémisphères (Figure 6A). Les protéines du divisome sont principalement localisées au centre de la cellule et parfois aux pôles (Morlot et al., 2003, 2004ab ; Zapun et al., 2008).

Une caractéristique intéressante des bactéries ovococques est que la division cellulaire commence avant même que le cycle précédent ne soit complété (Massidda et al., 2013). Cela se manifeste par un assemblage du divisome à trois positions différentes : un au centre de la cellule mère, qui correspond au site actif de division, et un à chaque site équatorial, qui représentent le futur site de division des cellules filles.

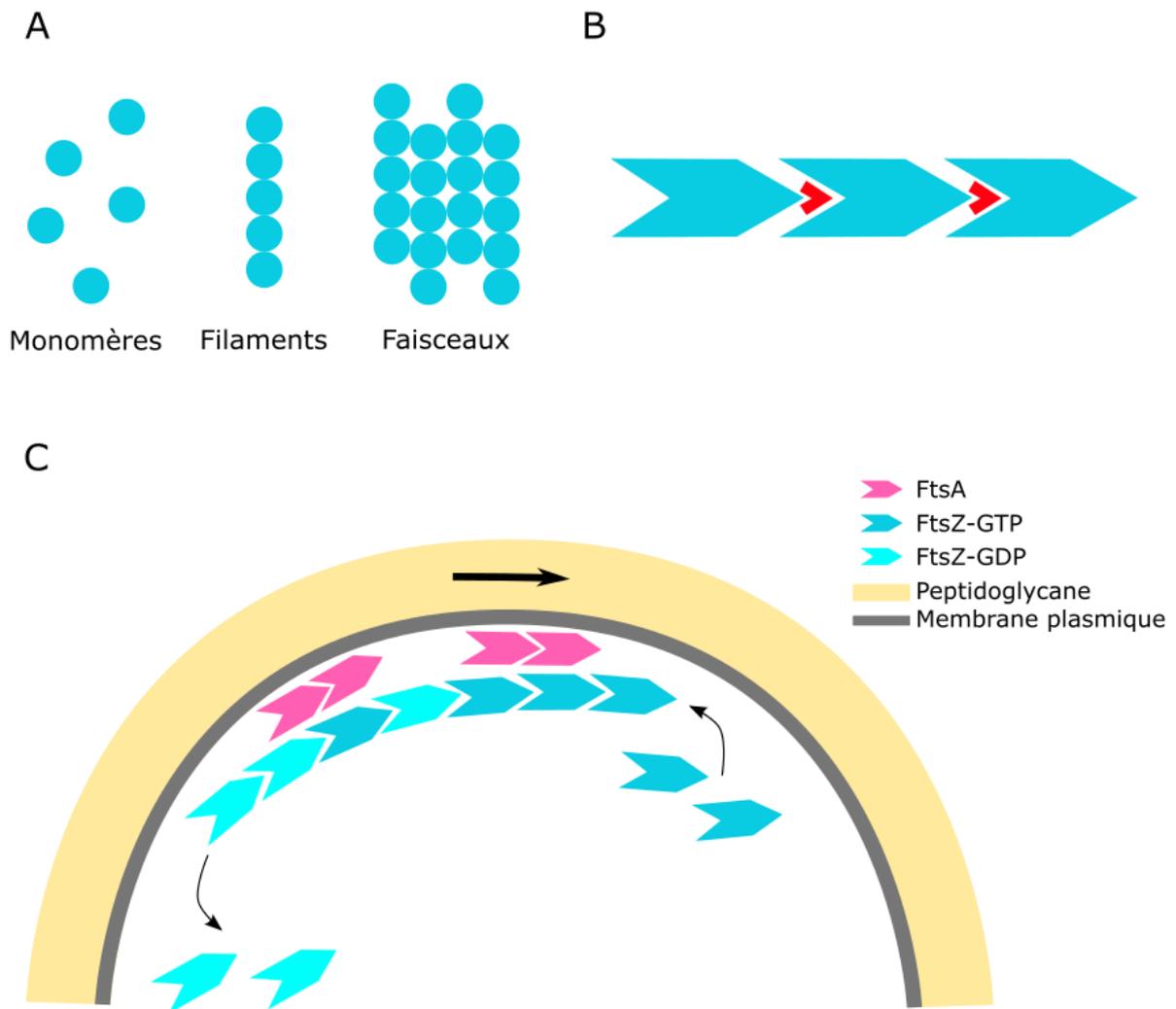


Figure 7 : Assemblage et polymérisation de FtsZ. A) Organisations de FtsZ, en monomères, en filaments simples ou en faisceaux plus larges (bundles en anglais). B) Modèle de polymérisation. Les monomères de FtsZ (en bleu) s'insèrent en « tête à queue » au niveau du site de fixation du GTP (en rouge). Adapté de (Adams & Errington, 2009). C) Modèle de polymérisation de FtsZ au centre de la cellule. L'anneau Z contient des filaments de FtsA (en rose) et de FtsZ (en bleu clair et bleu foncé) qui suivent un mouvement de *treadmilling*. Les monomères de FtsZ liés au GDP (bleu clair) se désassemblent des faisceaux alors que les monomères liés au GTP (bleu foncé) s'assemblent à l'extrémité opposée. Le sens apparent du mouvement est représenté par une flèche droite. Adapté de (Yang et al., 2017 ; Bisson-Filho et al., 2017 ; Ezrawa et al., 2018).

## 1.1) L'anneau Z

Les protéines du divisome sont généralement classées en protéines précoces ou tardives selon leur moment d'arrivée au site actif de division du pneumocoque. Parmi les protéines précoces, on retrouve notamment MapZ, FtsZ, FtsA, EzrA et SepF. Ces protéines sont associées à la formation de l'anneau Z au centre de la cellule et leur assemblage marque le début du processus de division cellulaire.

- FtsZ

La division cellulaire débute par l'assemblage de la protéine FtsZ (Filamenting temperature-sensitive mutant Z) en anneau concentrique situé au centre de la cellule. FtsZ est une protéine cytoplasmique, homologue de la tubuline chez les eucaryotes, très conservée chez les bactéries (Erickson, 1995 ; Margolin, 2000). Cette protéine s'assemble pour former une structure dynamique appelée l'anneau Z, qui se déplace autour du plan de division.

Les monomères de FtsZ polymérisent en protofilaments qui s'agencent en faisceaux plus larges (Bramhill & Thompson, 1994). Ils s'assemblent et se désassemblent en un mouvement rappelant celui d'un tapis roulant, appelé *treadmilling*. Un monomère de FtsZ est ajouté à l'extrémité du filament et un monomère est enlevé à l'autre extrémité (Bisson-Filho et al., 2017 ; Yang et al., 2017). Cette polymérisation en tête à queue, qui dépend de l'hydrolyse du GTP en GDP, se produit de manière séquentielle, formant ainsi des filaments de 120 à 200 nm composés de 30 à 50 monomères de FtsZ (Erickson et al., 2010) (Figure 7).

La première structure cristallographique de FtsZ a été obtenue chez *Methanocaldococcus jannaschii* (Löwe & Amos, 1998). Cette structure, très similaire à celle de la tubuline eucaryote, révèle un domaine N-terminal contenant le site de liaison au GTP et un domaine C-terminal avec une boucle T7. L'interaction entre la boucle T7 d'un monomère de FtsZ et le domaine de liaison au GTP d'un monomère adjacent forme le site actif. Chez le pneumocoque, un changement de fluorescence intrinsèque du tryptophane 294 a montré un changement conformationnel de FtsZ pendant la polymérisation, augmentant ainsi l'affinité pour la formation des polymères (Battaje et al., 2021). Les régions riches en FtsZ exerceraient une force contractile sur la membrane, tandis que les zones pauvres en FtsZ permettraient à l'anneau Z de réduire progressivement sa circonférence (Strauss et al., 2012 ; Jacq et al., 2015). Une autre étude suggère que la région C-terminale pourrait être



responsable de la génération de force lors de la constriction et de l'invagination de la membrane (Buske et al., 2015).

FtsZ hydrolyse également le GDP, ce qui, contrairement au GTP, entraîne une courbure des protofilaments et permet la formation d'une structure en anneau essentielle à la division cellulaire (Lu et al., 2000 ; Sheffers & Driessen, 2001). L'assemblage de ces polymères forme l'anneau Z, une structure indispensable à la constriction de la cellule bactérienne (Adams & Errington, 2009).

Les deux bactéries modèles les plus étudiées, *B. subtilis* et *E. coli*, qui ont une forme de bâtonnet, possèdent deux machineries distinctes pour la division cellulaire et l'élongation cellulaire, coordonnées respectivement par FtsZ et MreB. En revanche, chez le pneumocoque, MreB est absente, et c'est FtsZ qui coordonnerait à la fois l'élongation et la division cellulaire (Morlot et al., 2003 ; Jacq et al., 2015 ; Trouve et al., 2021).

- FtsA

FtsA (Filamenting temperature-sensitive mutant A) est une protéine essentielle chez le pneumocoque et très conservée chez les bactéries (Busiek & Margolin, 2015). Homologue à l'actine des eucaryotes, elle forme des filaments en hydrolysant l'ATP *in vitro* (Lara et al., 2005 ; Szwedziak et al., 2012). FtsA interagit avec la membrane grâce à une hélice amphipathique prédite en C-terminal (Sanchez et al., 1994 ; Pichoff & Lutkenhaus, 2005). Lors de la liaison à l'ATP, FtsA subit un changement conformationnel exposant l'hélice amphipathique et permettant l'association à la membrane et la polymérisation (Krupka et al., 2014). FtsA interagit avec FtsZ, favorisant ainsi l'assemblage et la stabilisation de l'anneau Z (Pichoff & Lutkenhaus, 2002). FtsA et FtsZ co-localisent tout au long du cycle cellulaire (Perez et al., 2019).

Chez le pneumocoque, FtsA est également indispensable pour la localisation de FtsZ au centre de la cellule (Lara et al., 2005 ; Mura et al., 2017). De plus, bien que précoce, des études récentes ont montré que FtsA interagit aussi avec des protéines tardives comme FtsW (voir chapitre III.2.3) pour activer la synthèse de peptidoglycane septal (Park et al., 2021).

Contrairement à *B. subtilis* et *E. coli*, la délétion de FtsA chez le pneumocoque entraîne la lyse cellulaire plutôt que la filamentation (Mura et al., 2017). La déplétion partielle de FtsA

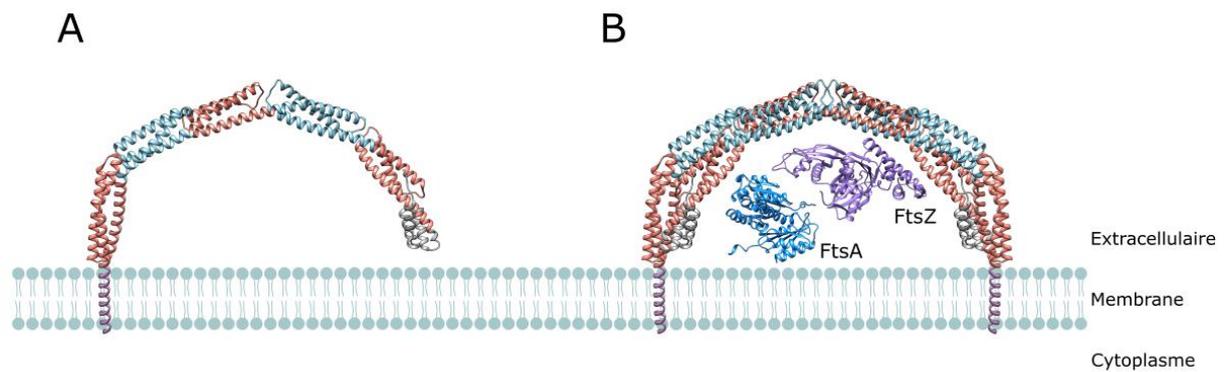


Figure 8 : EzrA de *S. pneumoniae*. A) Représentation AlphaFold2 de EzrA (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q8DQE5>). Les domaines spectrine sont représentés successivement en orange et en bleu. Le domaine cytoplasmique est représenté en gris et le domaine transmembranaire en violet. B) Modèle d'interaction entre EzrA, FtsA et FtsZ, basé sur les hypothèses de (Cleverley & Lewis, 2015) chez *B. subtilis*. Les structures de FtsA et FtsZ sont représentées avec les prédictions de AlphaFold2. Pour simplifier le modèle, les zones de FtsA et de FtsZ prédites non structurées ne sont pas représentées.

conduit à la formation de cellules allongées avec plusieurs anneaux de FtsZ qui ne peuvent pas achever la septation (Mura et al., 2017). De manière surprenante, la déplétion complète de FtsA entraîne la délocalisation des anneaux FtsZ, provoquant la formation de cellules en forme de ballon et finalement la lyse cellulaire (Mura et al., 2017). Ces résultats indiquent que FtsA est une protéine cruciale pour l'ancrage et/ou la stabilisation de l'anneau Z à la membrane. D'autres protéines du divisome, telles que EzrA, SepF et ZapA, sont associées à l'anneau Z et peuvent réguler la formation des filaments de FtsZ pendant la condensation de l'anneau Z mature (Perez et al., 2021).

- EzrA

EzrA (Extra Z-rings A) est une protéine présente chez les bactéries à Gram positif et est essentielle chez le pneumocoque (Thanassi et al., 2002 ; van Opijnen et al., 2009 ; Perez et al., 2021a). Elle possède un domaine cytoplasmique formant une structure en superhélice similaire aux spectrines des eucaryotes (Cleverley et al., 2014) (Figure 8A). Son hélice N-terminale lui permet de s'ancrer et de se stabiliser à la membrane (Cleverley et al., 2014). Un motif conservé de 7 acides aminés dans son domaine C-terminal, appelé motif QNR, est essentiel pour la localisation de l'anneau Z (Haeusser et al., 2007 ; Perez et al., 2021).

EzrA est recrutée au site de division par FtsZ (Levin et al., 1999) avec qui elle interagit (Perez et al., 2021). Il est proposé que EzrA forme des dimères qui s'assemblent en une structure en forme d'arche du côté cytoplasmique. Cette structure, caractéristique des spectrines, lui permettrait d'interagir avec FtsZ et de moduler les interactions latérales des filaments (Cleverley et al., 2014) (Figure 8B).

Comme FtsA, EzrA est retrouvée au niveau des filaments de FtsZ et participe également au *treadmilling* qui progresse jusqu'aux équateurs cellulaires, ce qui indique une forte association dynamique entre ces trois protéines (Perez et al., 2019). Cette observation remet en question l'hypothèse selon laquelle EzrA serait un régulateur négatif de FtsZ qui favoriserait sa dépolymérisation, comme cela a été rapporté initialement chez *B. subtilis* (Levin et al., 1999). En effet, EzrA est essentielle à la présence et à la localisation de FtsZ au site de division chez le pneumocoque. En revanche, une surproduction de EzrA entraîne l'apparition d'anneaux Z surnuméraires. Ces phénotypes, opposés à ceux observés chez

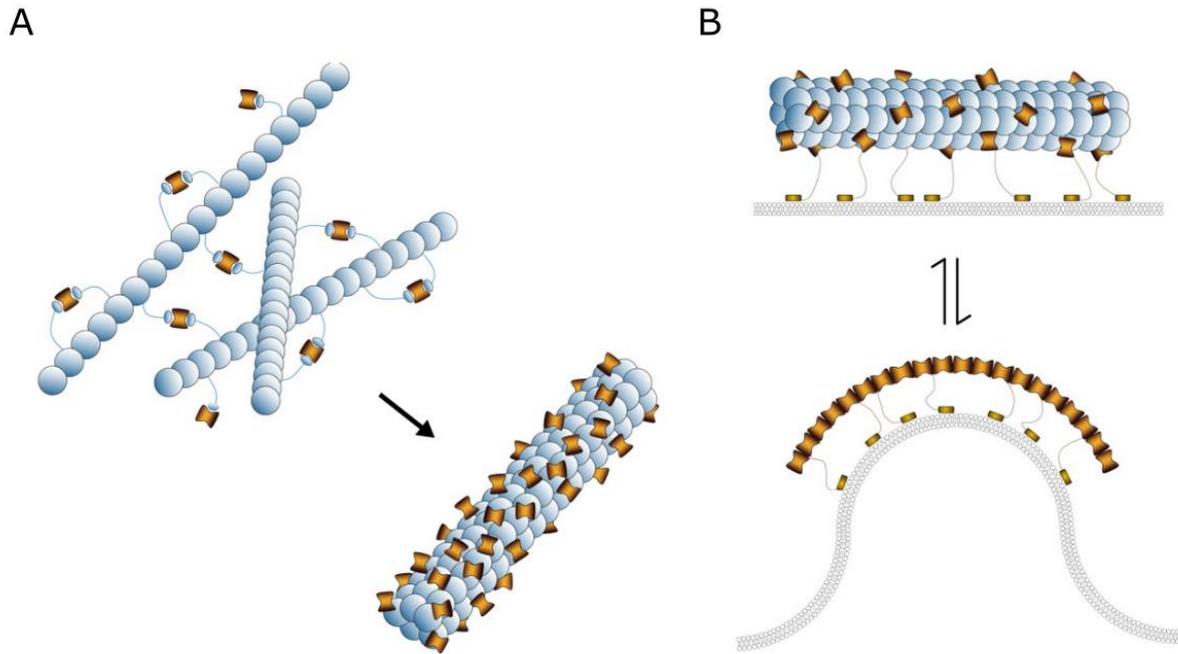


Figure 9 : Modèle de l'organisation de SepF chez *Corynebacterium glutamicum*. A) La formation du complexe SepF-FtsZ dans le cytoplasme conduit à la polymérisation de FtsZ. B) Les molécules de SepF sous forme d'homodimères liées aux filaments de FtsZ favoriseraient l'ancrage à la membrane (image du haut). Au contraire, les polymères de SepF interagissant avec la membrane permettraient le remodelage de la bicouche lipidique pour la formation du septum (image du bas). (Sogues et al., 2020).

*B. subtilis* (Haeusser et al., 2004), suggèrent plutôt un rôle de régulateur positif pour EzrA chez *S. pneumoniae*.

D'autre part, des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que EzrA forme un complexe avec de nombreuses protéines impliquées dans le positionnement de l'anneau Z (MapZ), sa stabilisation (FtsZ, FtsA, ZapA et SepF), la ségrégation du chromosome (FtsK et possiblement DivIVA), la synthèse du peptidoglycane (PBP1a et possiblement PBP2x), et la régulation du peptidoglycane (GpsB et StkP). Des expériences de double hybride bactérien montrent que EzrA interagit directement avec ces protéines, à l'exception de ZapA (Perez et al., 2021).

Par ailleurs, EzrA joue un rôle important dans la ségrégation du chromosome, probablement en modulant le positionnement et l'organisation de l'anneau Z, de manière analogue aux régulateurs de l'anneau Z chez les bactéries en forme de bâtonnet (Perez et al., 2021).

- SepF

SepF est une protéine membranaire conservée parmi les bactéries à Gram positif (Hamoen et al., 2006). Elle interagit avec FtsZ, et sa localisation au site de division dépend de FtsZ (Hamoen et al., 2006 ; Singh et al., 2008 ; Sogues et al., 2020). Elle interagit également avec la membrane plasmique (Sogues et al., 2020). Le modèle de l'organisation de SepF chez *B. subtilis* propose que SepF forme des anneaux perpendiculaires aux filaments de FtsZ, favorisant leur regroupement en structures plus larges (Singh et al., 2008 ; Duman et al., 2013). En effet, SepF diminue l'activité GTPase de FtsZ, ce qui limite le désassemblage des protofilaments (Singh et al., 2008). Une étude récente chez *Corynebacterium glutamicum* a permis de caractériser les détails moléculaires de l'interaction de SepF avec FtsZ et la membrane. Alors que le domaine C-terminal de SepF interagit avec FtsZ via les motifs ultra conservés de son domaine C-terminal, le domaine N-terminal de SepF interagit avec les lipides de la membrane. Les filaments de FtsZ et les lipides de la membrane auraient un effet opposé sur la polymérisation de SepF, l'interaction avec la membrane favoriserait la polymérisation de SepF alors que l'interaction avec FtsZ favoriserait sa dépolymérisation (Figure 9). SepF aurait ainsi plusieurs rôles et serait impliquée dans la polymérisation de FtsZ, l'ancrage de l'anneau Z à la membrane et le remodelage de la membrane nécessaire à l'assemblage et au fonctionnement du divisome (Sogues et al., 2020).



La délétion du gène codant pour SepF conduit à des cellules présentant plusieurs anneaux FtsZ, des phénomènes de multi-septation, une augmentation de la largeur cellulaire avec un septum fin et une constriction précoce. On observe parfois la présence de cellules allongées et de mini cellules (Massidda et al., 1998 ; Fadda et al., 2003 ; Mura et al., 2017). D'autre part, la surproduction de FtsA permet de compenser les effets néfastes d'une délétion de SepF, ce qui suggère que FtsA et SepF pourraient avoir des fonctions redondantes. Enfin, SepF se localise au septum plus tardivement que FtsZ, ce qui suggère que SepF jouerait un rôle dans les étapes tardives de la division cellulaire (Mura et al., 2017).

- ZapA et ZapJ

ZapA est une protéine conservée chez les bactéries à Gram-positif et Gram-négatif. Chez ces dernières, ZapA interagit avec la protéine ZapB et ont toutes deux un rôle dans l'assemblage de l'anneau Z (Ebersbach et al., 2008 ; Galli & Gerdes, 2012 ; Caldas et al., 2019). Chez *S. pneumoniae*, ZapA interagit avec la protéine ZapJ, spécifique des Streptococci qui n'ont pas d'homologues à ZapB (Perez et al., 2021). La première structure cristallographique de ZapA a été obtenue chez *Pseudomonas aeruginosa*. ZapA s'organise en dimères qui s'assemblent pour former des tétramères antiparallèles. Ces tétramères pourraient former des ponts moléculaires entre les polymères de FtsZ afin de stabiliser l'anneau Z (Low et al., 2004).

Les cellules délétées du gène codant pour ZapA et ZapJ ont une croissance similaire à une souche sauvage et ne présentent pas de défauts morphologiques majeurs (Perez et al., 2021). En revanche, la déplétion du gène codant pour EzrA dans un mutant  $\Delta zapA$  ou  $\Delta zapJ$  affecte considérablement la croissance cellulaire, suggérant ainsi que ZapA et ZapJ sont des régulateurs positifs de l'anneau Z chez *S. pneumoniae* (Perez et al., 2021). Les deux protéines interagissent entre elles et co-localisent au centre de la cellule tout au long de la division cellulaire. ZapA et ZapJ s'assemblent plus tardivement que FtsZ-FtsA-SepF-EzrA au site de division (Perez et al., 2021). Ainsi, comme SepF et EzrA, les protéines non essentielles ZapA et ZapJ sont des régulateurs positifs impliqués dans le positionnement et la stabilité de l'anneau Z (Perez et al., 2021).

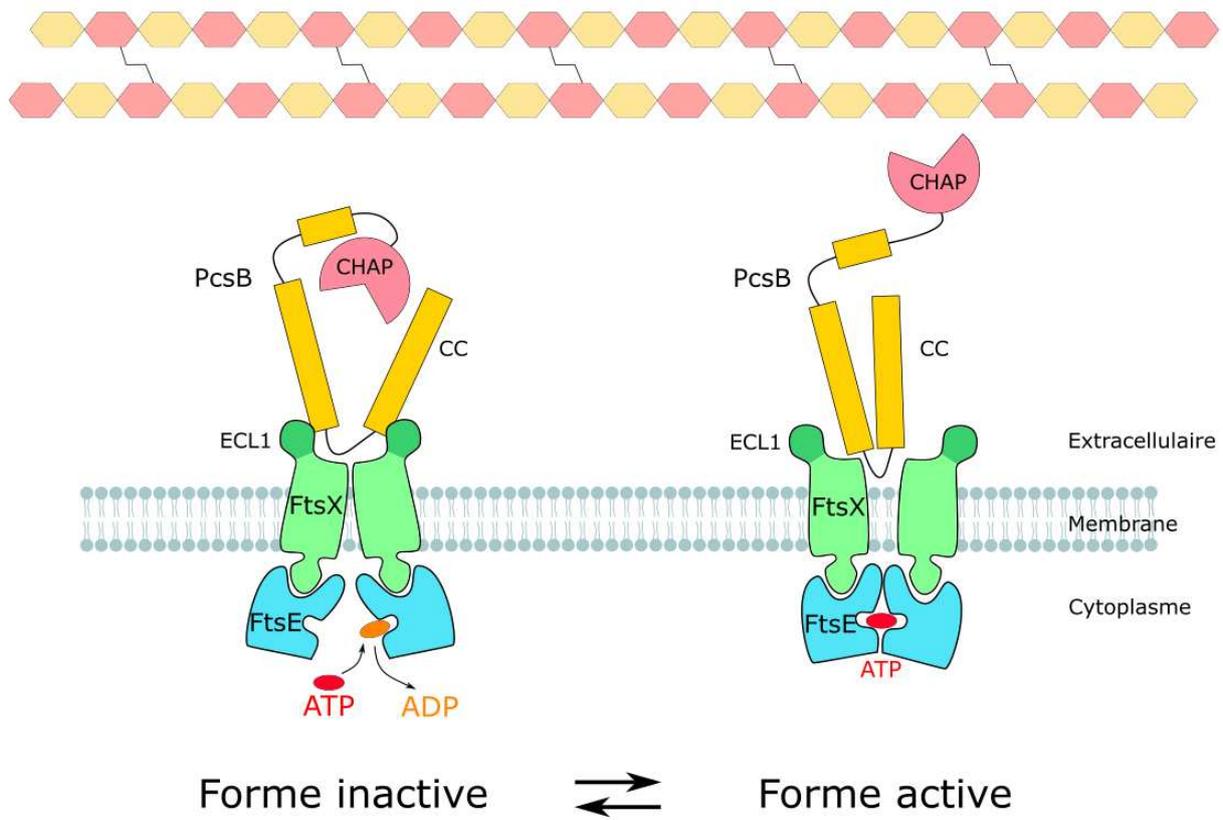


Figure 10 : Modèle de régulation de PcsB par FtsEX chez *S. pneumoniae*. Les domaines coiled-coil (CC) de PcsB interagissent avec la boucle extracellulaire 1 (ECL1, vert foncé) de FtsX. Cette interaction est indépendante de la liaison à l'ATP. Le domaine catalytique de PcsB est autoinhibé et peut être activé lors de la liaison de FtsE à l'ATP. Le complexe FtsEX hydrolyse l'ATP, ce qui conduit à un changement conformationnel du complexe et à l'activation du domaine CHAP de PcsB. D'après (Alcorlo et al., 2020).

## 1.2) Les autres composants du divisome

- FtsEX, PcsB

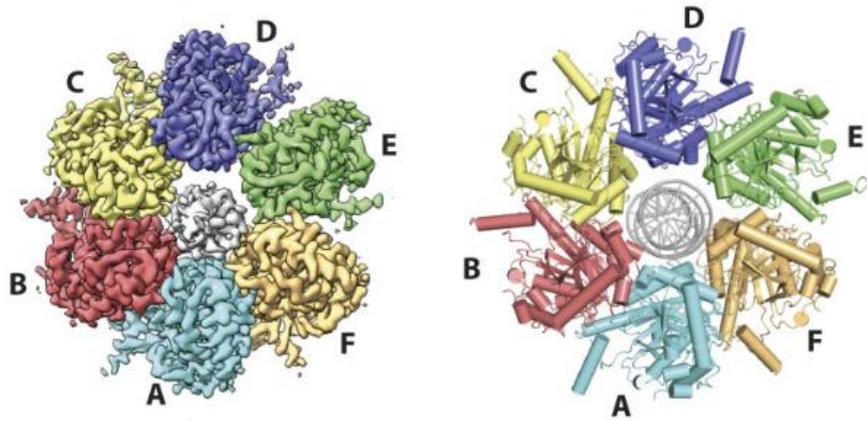
FtsEX est un complexe largement conservé parmi les bactéries, il est impliqué dans la régulation de l'hydrolyse de la paroi cellulaire chez *S. pneumoniae*. FtsX est une protéine membranaire intégrale et FtsE est une ATPase cytoplasmique qui s'associe au domaine cytoplasmique de FtsX (Pichoff et al., 2019 ; Rued et al., 2019 ; Alcorlo et al., 2020). Ce complexe forme une structure qui ressemble aux ABC transporteurs (Leeuw et al., 1999). Cependant FtsEX n'a pas de fonction de transporteur mais est impliqué dans l'hydrolyse de la paroi cellulaire en interagissant avec l'hydrolase PcsB (Sham et al., 2011 ; Sham et al., 2013). Cette interaction entre FtsX et PcsB est essentielle à l'activité hydrolytique de PcsB (Rued et al., 2019). Plus précisément, le changement conformationnel de FtsEX, dépendant de l'activité ATPase de FtsE, induit l'activation de PcsB (Bajaj et al., 2016 ; Alcorlo et al., 2020). De récentes études ont permis de déterminer les zones d'interaction entre PcsB et FtsX et d'établir un modèle pour l'activation de PcsB par le complexe FtsEX (Figure 10). La large boucle extracellulaire de FtsX (ECL1) interagit avec le domaine coiled-coil (CC) de PcsB, et cette interaction est essentielle pour la croissance et la morphologie du pneumocoque (Sham et al., 2011 ; Sham et al., 2013 ; Rued et al., 2019). D'autre part, l'interaction entre FtsE et FtsX est essentielle à l'activité de FtsX *in vivo* et est également indispensable à la croissance et à la morphologie cellulaire (Alcorlo et al., 2020).

FtsEX et PcsB sont essentielles chez le pneumocoque, et la déplétion d'un des gènes codant pour ces protéines dans des souches non capsulées conduit à la formation de chaînes de cellules arrondies et comprimées (Sham et al., 2013).

- FtsK

FtsK est une translocase très conservée chez les bactéries et impliquée dans la ségrégation du chromosome (Aussel et al., 2002). La structure cristallographique du domaine moteur de FtsK de *Pseudomonas aeruginosa* a été résolue (Massey et al., 2006 ; Jean et al., 2020) (Figure 11A). FtsK forme un homo-hexamère, où chaque sous-unité adopte une conformation distincte à chaque étape de translocation. L'hydrolyse de l'ATP se produit dans l'une des 6 sous-unités. A chaque étape, une sous unité se fixe à l'extrémité finale de l'ADN tandis qu'une autre se détache de l'extrémité initiale, permettant ainsi à l'ADN de

A



B

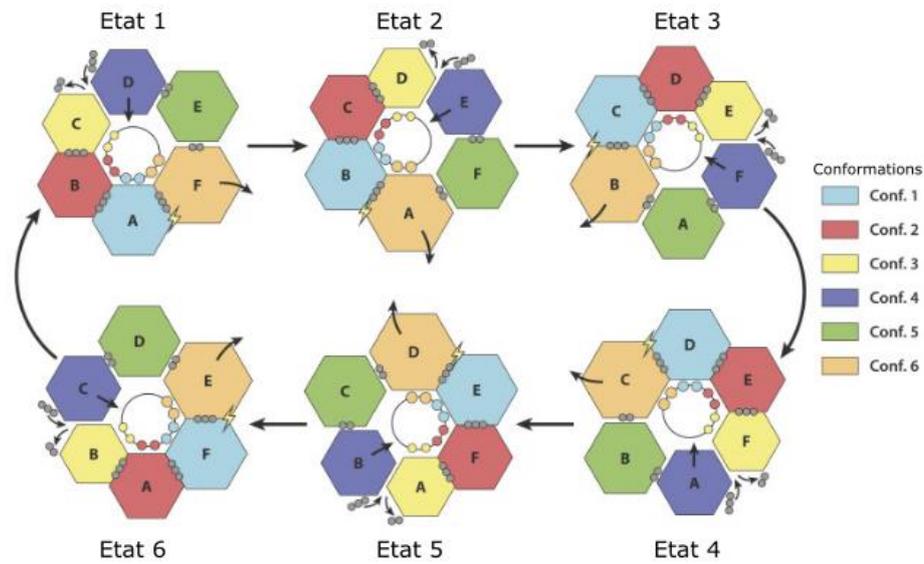


Figure 11 : Translocation de l'ADN par FtsK. A) Structure du domaine moteur de FtsK avec de l'ADN double brin. Structure résolue par Cryo-microscopie électronique (à gauche) et modèle atomique raffiné (à droite). Chaque sous unité est colorée différemment et l'ADN double brin de trouve au centre de l'anneau. B) Modèle pour la translocation de l'ADN. A chaque étape (état 1 à 6), chaque sous-unité change de conformation pour adopter celle de la suivante. Cela créé une rotation de l'ADN de 2 paires de base par étape. Ronds gris : phosphates. Eclairs jaunes : état de compétence pour l'hydrolyse. Cercles avec les ronds colorés : ADN. D'après (Jean et al., 2020).

progresser à travers l'hexamère par rotation (Figure X3 B). Cela permet ainsi à FtsK de résoudre les dimères chromosomiques (Jean et al., 2020). Le reste de la protéine est constitué d'une longue région désordonnée reliant le domaine moteur à l'ancre membranaire. Cette région permettrait le positionnement correct des brins d'ADN à la sortie du moteur, garantissant ainsi que chaque cellule fille reçoive un chromosome complet avant la séparation (Briggs et al., 2021).

- DivIB, DivIC, FtsL

Le complexe DivIBC-FtsL du pneumocoque est homologue au complexe FtsQBL chez *E. coli* (où DivIB est FtsQ et DivIC est FtsB). Les trois protéines partagent une topologie similaire, comprenant un court domaine cytoplasmique N-terminal, un passage transmembranaire et un large domaine extracellulaire (Errington et al., 2003 ; Noirclerc-Savoie et al., 2005). Dans le cas du pneumocoque, le complexe DivIBC-FtsL co-localise au septum de division uniquement lors de la septation (Noirclerc-Savoie et al., 2005). En effet, au début de la division cellulaire, DivIC se localise au site de division alors que DivIB et FtsL se trouvent dans les deux hémisphères de la cellule. Lors de la septation, DivIC interagit avec FtsL, ce qui permet le recrutement de FtsL au septum de division. DivIB interagit avec DivIC-FtsL et est ainsi également recrutée au septum de division (Noirclerc-Savoie et al., 2005).

Chez le pneumocoque, la délétion du gène codant pour DivIB conduit à la formation de longues chaînes avec parfois plusieurs septa de division (Gouëllec et al., 2008). De plus, en l'absence de DivIB, FtsL est rapidement dégradée, suggérant que DivIB joue un rôle dans la stabilisation de FtsL (Gouëllec et al., 2008).

Ces trois protéines sont impliquées dans la division cellulaire, mais leur rôle précis n'a pas encore été établi. Chez *E. coli* et *P. aeruginosa*, les homologues du complexe DivIB-FtsL sont impliqués dans la régulation des synthèses du peptidoglycane (Boes et al., 2019 ; Marmont & Bernhardt, 2020). FtsL est essentielle chez *E. coli* et jouerait un rôle dans la sensibilité au zinc et la perméabilité de la membrane (Guzman et al., 1992 ; Blencowe et al., 2011). Le rôle de FtsL n'est pas connu chez le pneumocoque, mais le complexe étant conservé parmi les bactéries, il est envisageable que la fonction de cette protéine soit également conservée.

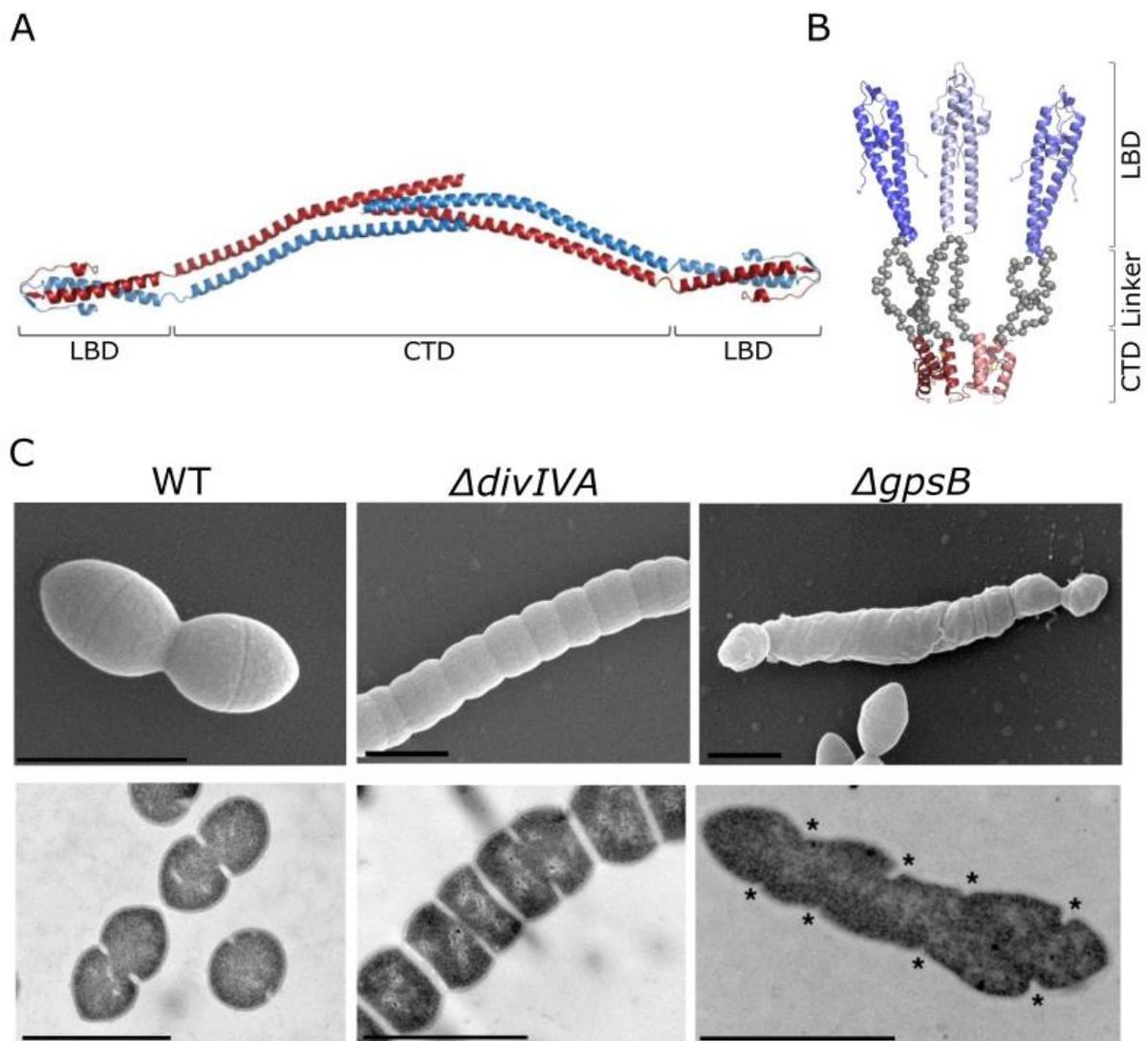


Figure 12 : Caractéristiques structurales et morphologiques de DivIVA et GpsB. A) Modèle de la structure de DivIVA de *Bacillus subtilis*, assemblé à partir des structures cristallographiques des domaines d'ancrage à la membrane (LBD) et C-terminal (CTD) (Oliva et al., 2010 ; Halbedel & Lewis, 2019). DivIVA est représentée comme s'organisant en tétramères, interagissant via ses domaines CTD. B) Modèle de la structure de GpsB de *Bacillus subtilis*, organisée en hexamères, assemblée à partir des données obtenues par SAXS (Cleverley et al., 2016). C) Images de microscopie électronique à balayage (SEM) (panel du haut) et images de microscopie électronique à transmission (MET) (panel du bas) de la souche sauvage du pneumocoque (WT) et des mutants de délétion de *divIVA* et de *gpsB*. Barres d'échelle : 1  $\mu$ m. D'après (Fleurie et al., 2014b).

- CcrZ

CcrZ (Cell Cycle Regulator protein interacting with FtsZ) est une protéine conservée chez les Pneumococci et les Firmicutes apparentés tels que *B. subtilis* ou *S. aureus*. Elle interagit directement avec FtsZ et contrôle la réplication de l'ADN en modulant l'activité de l'initiateur de la réplication, DnaA (Gallay et al., 2021). CcrZ localise en anneau au niveau du site de division et se relocalise aux sites équatoriaux une fois la réplication de l'ADN terminée. En l'absence de CcrZ, les cellules présentent une division cellulaire aberrante avec des chromosomes mal séparés et des cellules anucléées (Gallay et al., 2021). De manière intéressante, l'inactivation des gènes codant pour FtsK ou RocS (le régulateur de la ségrégation du chromosome (Mercy et al., 2019)) aggrave les défauts morphologiques observés chez un mutant  $\Delta ccrZ$ , ce qui suggère que CcrZ joue un rôle crucial dans l'intégrité du chromosome (Gallay et al., 2021).

- DivIVA

DivIVA est une protéine de type tropomyosine constituée d'un domaine N-terminal hautement conservé et d'un domaine C-terminal (C-terminal domain, CTD) riche en superhélices, dont la composition et la longueur peuvent varier (Oliva et al., 2010, Massidda et al., 2013). Son domaine N-terminal (Lipid-binding domain, LBD) lui permet de s'ancrer à la membrane (Oliva et al., 2010). La résolution de la structure cristallographique de DivIVA de *B. subtilis* a montré que la protéine s'organise en tétramères (Oliva et al., 2010) (Figure 12A). De manière intéressante, DivIVA se localise à la fois aux sites de division et aux pôles de la cellule. Cette distribution s'explique par sa capacité à s'accumuler dans les régions membranaires présentant une forte courbure négative (Lenarcic et al., 2009).

La délétion du gène codant pour DivIVA chez le pneumocoque conduit à la formation de longues chaînes de cellules, plus larges et plus rondes, avec un septum incomplet et souvent des cellules dépourvues de nucléoïde, ce qui indique un problème de ségrégation des chromosomes (Fadda et al., 2003) (Figure 12C).

Bien que son rôle ne soit pas encore entièrement élucidé, DivIVA semble jouer un rôle médiateur dans la division cellulaire, la morphologie cellulaire (potentiellement via la synthèse de peptidoglycane) et la ségrégation du chromosome chez le pneumocoque (Fadda et al., 2007 ; Fleurie et al., 2014b ; Straume et al., 2017 ; Vollmer et al., 2019).



- GpsB

GpsB est une protéine très conservée chez les bactéries à Gram-positif et essentielle chez certaines souches de *S. pneumoniae*. C'est une protéine cytoplasmique capable d'interagir avec les protéines de la synthèse de la paroi cellulaire pour assurer leur positionnement correct. Des comparaisons de séquence et une analyse phylogénétique ont montré que GpsB était un paralogue de DivIVA. En effet, le domaine N-terminal de GpsB et celui de DivIVA possèdent une forte similarité de séquence (Wu et Errington, 2004 ; Tavares et al., 2008). GpsB possède en effet un domaine LBD très similaire à celui de DivIVA qui lui permet d'interagir avec la membrane et un domaine CTD avec des superhélices plus courtes et parallèles (Rismondo et al., 2016 ; Halbedel & Lewis, 2019) (Figure 12B). Chez *S. pneumoniae*, la structure cristallographique du domaine LBD de GpsB en complexe avec le court domaine cytoplasmique de PBP2x a également été résolue (Cleverley et al., 2019).

Des études récentes ont montré que GpsB fonctionne comme une protéine adaptatrice qui facilite l'interaction entre les différentes protéines membranaires intervenant dans la division cellulaire pour générer de plus grands complexes protéiques à des sites spécifiques (Cleverley et al., 2019). Notamment chez *S. pneumoniae*, des expériences de synthèse létalité ont montré que GpsB pourrait réguler PBP2a et interagir avec PBP1a (Rued et al., 2017). GpsB interagit également avec PBP2x et MreC (Cleverley et al., 2019).

La délétion du gène codant pour GpsB conduit la formation de cellules plus larges et plus longues avec de multiples nucléoïdes non ségrégés, ce qui entraîne la lyse cellulaire (Land et al., 2013) (Figure X4 C). Ce phénotype d'allongement des cellules est contraire à celui provoqué par l'absence de DivIVA. Ainsi, l'absence de DivIVA bloque l'élongation cellulaire alors que l'absence de GpsB bloque la septation (Fleurie et al., 2014b).

## 2) Régulation du divisome

L'établissement précis du site de division est d'une importance capitale avant la division cellulaire. Ce processus est étroitement lié au positionnement précis de l'anneau Z, dont la régulation est assurée par des systèmes spécialisés de positionnement.

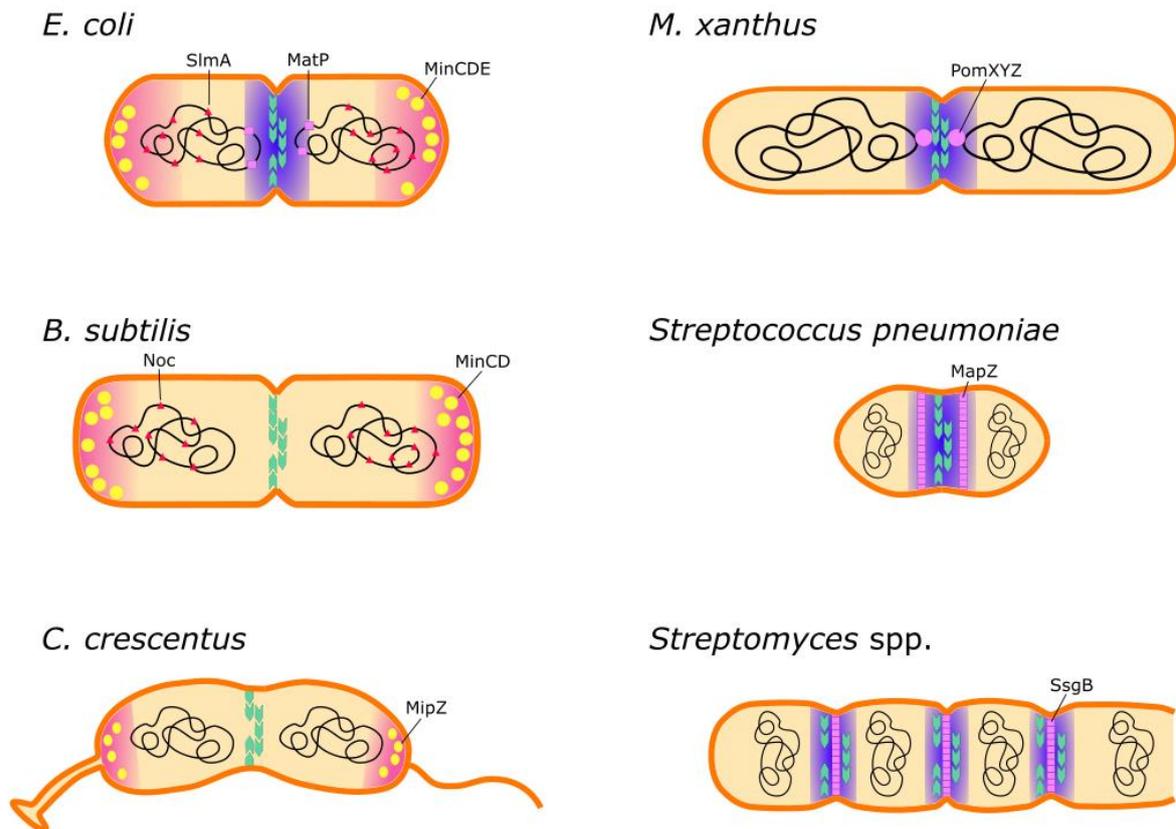


Figure 13 : Systèmes de positionnement de l'anneau Z chez différentes bactéries. Les systèmes de positionnement négatifs sont représentés par un gradient rouge et les systèmes positifs par un gradient bleu. Les régulateurs négatifs (Min, MipZ, SlmA, Noc) inhibent la formation de l'anneau Z dans l'ensemble du corps cellulaire sauf au centre de la cellule (mid-cell). Les régulateurs positifs (MatP, MapZ, SsgB, PomXYZ) localisent au centre de la cellule avant l'anneau Z pour permettre son assemblage. L'anneau Z est représenté par des flèches vertes, les systèmes d'occlusion du nucléoïde par des triangles rouges. Les systèmes de positionnement négatifs sont représentés par un cercle jaune ou et les systèmes de positionnement positifs par des cercles et des carrés rose.

## 2.1) Les systèmes de positionnement négatifs

Les bactéries de forme bâtonnet utilisent deux systèmes clés pour assurer la localisation précise du plan de division au centre de la cellule. Le premier est le système Min, qui empêche la division aux pôles de la cellule (Lutkenhaus, 2007 ; Bramkamp & van Baarle, 2009). Le second est l'occlusion du nucléoïde, qui prévient la division cellulaire au niveau du chromosome en empêchant la formation du septum en présence du matériel génétique (Wu & Errington, 2012) (Figure 13).

- Le système Min

Les protéines MinC et MinD sont très conservées chez les bactéries. Chez *E. coli*, l'ATPase MinD s'ancre à la membrane en formant un complexe avec l'ATP et recrute MinC. MinC déstabilise les polymères de FtsZ et inhibe ainsi la formation de l'anneau Z (Figure 13). La délétion du gène *minC* conduit au mauvais positionnement de l'anneau Z, entraînant la formation de mini-cellules non viables. A l'inverse, la surexpression du gène *minC* bloque complètement la polymérisation de FtsZ, y compris au septum de division, formant ainsi des cellules en forme de filaments (de Boer et al., 1989 ; de Boer et al., 1992). La régulation spatiale de MinCD nécessite la présence de la protéine MinE. En son absence, MinCD se localisent dans toute la membrane et empêchent la polymérisation de FtsZ même au centre de la cellule (De Boer et al., 1989 ; Raskin & De Boer, 1997 ; Hu & Lutkenhaus, 1999). MinE forme un anneau qui libère progressivement MinCD de la membrane en stimulant l'activité ATPase de MinD. Le complexe MinD-ADP cytoplasmique se régénère en MinD-ATP et se réassemble dans la membrane au pôle opposé, où la concentration en MinD est la plus faible. Ce processus répété crée une oscillation de MinCD d'un pôle à l'autre, formant un gradient où la concentration de MinCD est la plus forte aux pôles, orientant ainsi la polymérisation de FtsZ au centre de la cellule.

Chez *B. subtilis*, la protéine MinE est absente. MinCD n'oscillent pas mais sont séquestrés aux pôles de la cellule grâce à DivIVA et à la protéine MinJ (Bramkamp et al., 2008 ; Eswaramoorthy et al., 2011 ; Ramamurthi & Losick, 2009) (Figure 13). DivIVA recrute MinJ aux pôles, qui recrute à son tour MinD. Ce dernier s'associe à la membrane avec MinC (Bramkamp et al., 1998 ; Marston & Errington, 1999 ; Patrick & Kearns, 2008).



- Le système d'occlusion par le nucléoïde

Le système d'occlusion par le nucléoïde (NO) est essentiel pour prévenir le pincement de l'ADN lors de la division cellulaire, en bloquant la formation de l'anneau Z dans les régions riches en ADN. Il est assuré par la protéine SlmA chez *Escherichia coli* et par la protéine Noc chez *Bacillus subtilis* (Wu & Errington, 2004 ; Bernhardt & de Boer, 2005) (Figure 13).

Chez *E. Coli*, SlmA se lie à des séquences spécifiques de l'ADN appelées « SlmA-Binding Sites » (SBSs). Ce sont des séquences palindromiques réparties sur tout le chromosome à l'exception de la région Ter. Simultanément, SlmA interagit avec FtsZ via sa queue C-terminale et inhibe sa polymérisation (Du & Lutkenhaus, 2014). La structure cristallographique du complexe SlmA-SBS montre que la protéine forme un dimère de dimère et interagit avec l'ADN via son domaine hélice-tour-hélice selon une conformation spécifique (Tonthat et al., 2013). Ce complexe SlmA-SBS favorise le désassemblage des protofilaments sans impacter l'activité GTP de FtsZ (Cabré et al., 2015).

Chez *B. subtilis*, la protéine Noc, sans similarité de séquence avec SlmA, se fixe également à l'ADN sur des séquences palindromiques appelées « Noc-Binding Sites » (NBSs) grâce à son domaine hélice-tour-hélice (Wu & Errington, 2004 ; Wu et al., 2009). Une étude récente a montré que Noc forme des condensats dans la membrane, selon un mécanisme de séparation de phase liquide-liquide (Babl et al., 2022). Ces condensats peuvent interagir avec la membrane et recruter FtsZ.

Comme les séquences SBSs et NBSs sont présentes sur tout le chromosome à l'exception de la région Ter, le phénomène d'occlusion par le nucléoïde disparaît lorsque la réplication et la ségrégation du chromosome sont pratiquement achevées, permettant ainsi à FtsZ de former l'anneau Z et d'amorcer la constriction cellulaire (Wu et al., 2009 ; Tontath et al., 2011).

- MipZ

Chez *Caulobacter crescentus*, les systèmes Min et NO sont absents. Cependant, un autre système de positionnement négatif est présent, régulé par l'ATPase MipZ (Figure 13). MipZ est conservée chez toutes les alphaprotéobactéries qui ne possèdent pas le système MinCD. MipZ forme un complexe avec la protéine de partitionnement ParB, située près de l'origine de réplication (Thanbichler & Shapiro, 2006). ParB interagit avec l'origine de réplication OriC du chromosome, et le complexe ParB-MipZ se localise ainsi aux pôles cellulaires, dans les



régions OriC dupliquées. MipZ interagit directement avec FtsZ (Thanbilcher & Shapiro, 2006) empêchant sa polymérisation en séquestrant les monomères de FtsZ et en couvrant les extrémités des polymères (Guerrero et al., 2020). Par conséquent, MipZ permet la formation de l'anneau Z au centre de la cellule, où la concentration de MipZ est la plus faible. MipZ est impliquée dans la régulation spatiale et temporelle de la division cellulaire, assurant à la fois le positionnement correct de l'anneau Z et l'assemblage du divisome après l'initiation de la ségrégation du chromosome.

## 2.2) Les systèmes de positionnement positifs

Il existe également des systèmes de positionnement positifs du divisome qui permettent de garantir la localisation précise de la division cellulaire. Ces systèmes reposent sur la reconnaissance de repères spécifiques présents à l'endroit où la division cellulaire doit avoir lieu.

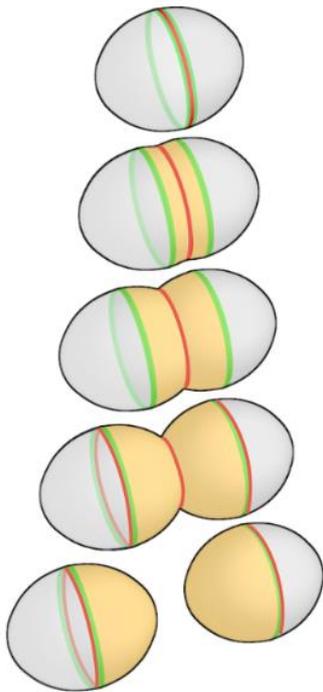
- SsgA / SsgB

La bactérie *Streptomyces coelicolor* présente un mécanisme de contrôle de la division cellulaire différent des systèmes canoniques Min et NO. Elle utilise un système de régulation positif basé sur les protéines SsgA et SsgB (Figure 13). SsgA marque le site de remodelage du peptidoglycane (Noens et al., 2007), ce qui permet la localisation précise de SsgB. SsgB recrute FtsZ aux futurs sites de division, stimulant ainsi sa polymérisation pendant la sporulation. Cette interaction ancre l'anneau Z à la membrane, assurant un positionnement adéquat du divisome (Willemse et al., 2011).

- PomX / PomY / PomZ

Chez *Myxococcus xanthus*, le positionnement précis de la machinerie de division cellulaire est assuré par le système PomX-PomY-PomZ (Treuner-Lange et al., 2013 ; Schumacher et al., 2017) (Figure 13). Ces trois protéines forment un anneau aux futurs sites de division cellulaire et stimulent la formation de l'anneau Z. PomZ intervient dans la sélection du site de division. D'autre part, PomX permet l'assemblage du complexe PomXYZ en anneau au centre de la cellule. Une fois localisées au site actif de division, les protéines PomXY interagissent avec FtsZ, favorisant son recrutement au centre de la cellule (Schumacher et al., 2017).

A



— Nouvelle paroi cellulaire

— MapZ

— Divisome (FtsZ)

B

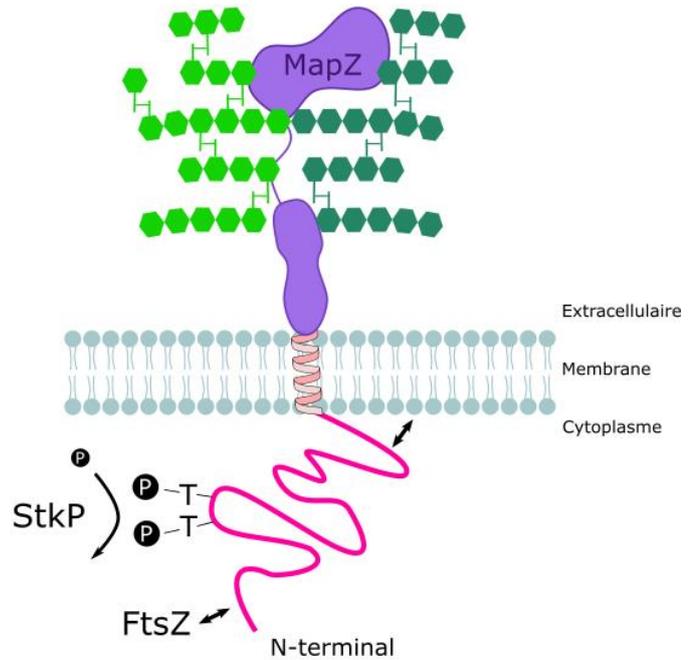


Figure 14 : MapZ chez *S. pneumoniae*. A) MapZ (en vert) se localise avant FtsZ pour marquer le site de division cellulaire. B) MapZ est une protéine bitopique composée d'un domaine extracellulaire interagissant avec le peptidoglycane et d'un domaine cytoplasmique majoritairement non structuré et phosphorylé par StkP. Le domaine cytoplasmique interagit avec FtsZ et avec la membrane plasmique.

- MapZ

Le positionnement précis de l'anneau Z chez *S. pneumoniae* est régulé par un système de régulation positif orchestré par la protéine MapZ (Midcell anchored protein Z), aussi appelée LocZ (Fleurie et al., 2014a ; Holečková et al., 2015) (Figure 13). MapZ interagit avec FtsZ et agit comme une balise moléculaire marquant le site de division au centre de la cellule avant le recrutement de FtsZ (Fleurie et al., 2014a). Dès que la synthèse de la paroi cellulaire est initiée, l'anneau formé par MapZ se scinde en deux anneaux qui s'éloignent au fur et à mesure que le nouveau peptidoglycane est inséré (Figure 14A). En marquant les frontières entre le nouveau et l'ancien peptidoglycane, MapZ préfigure les futurs sites de division au centre des cellules filles. La délétion du gène codant pour MapZ entraîne des défauts de localisation de FtsZ, qui n'est pas en mesure d'identifier le site de division. Le placement de l'anneau Z est par conséquent fortement altéré, conduisant à la formation de cellules de taille et de morphologie aberrantes (Fleurie et al., 2014a).

MapZ est une protéine bitopique possédant un domaine cytoplasmique en N-terminal, qui interagit avec FtsZ et un domaine extracellulaire en C-terminal, qui interagit avec le peptidoglycane (Fleurie et al., 2014a) (Figure 14B).

Le domaine cytoplasmique est intrinsèquement désordonné et présente deux régions avec des propensions à former des hélices (résidus 45 à 68 et 79 à 95), la première d'entre elles étant hautement conservée parmi les Streptococcaceae (Ashkenazy et al., 2016). La région N-terminale de MapZ (résidus 1 à 41) est nécessaire à l'interaction avec FtsZ, sous forme monomérique ou oligomérique. Le domaine cytoplasmique de MapZ (résidus 1 à 110) interagit également avec les lipides chargés négativement, ce qui suggère une interaction avec la membrane (Hosek et al., 2020). La région d'interaction avec les lipides chevauche complètement celle de FtsZ et la compétition d'interaction entre la membrane et FtsZ pourrait permettre de moduler la fluidité membranaire au site de division, ce qui pourrait constituer une étape nécessaire à la constriction cellulaire (Hosek et al., 2020).

Le domaine extracellulaire de MapZ est composé de deux sous-domaines séparés par un linker flexible (Manuse et al., 2016). Le sous-domaine distal à la membrane interagit avec le peptidoglycane et est nécessaire au positionnement de MapZ au futur site de division (Manuse et al., 2016). Le sous domaine proche de la membrane sert de piédestal en assurant le positionnement adéquat du domaine distal pour son interaction avec le peptidoglycane



(Manuse et al., 2016). Il est intéressant de noter que MapZ n'interagit pas avec le peptidoglycane produit par *E. coli* ou *B. subtilis*. Ceci suggère que MapZ est capable de reconnaître l'architecture ou la composition spécifique du peptidoglycane produit par le pneumocoque au début de la phase d'élongation. Cette spécificité n'a toutefois pas encore été identifiée (Manuse et al., 2016).

Le domaine cytoplasmique de MapZ présente deux sites de phosphorylation. Ces sites sont phosphorylés par la sérine-thréonine protéine-kinase StkP, qui est un régulateur global du cycle cellulaire du pneumocoque (Manuse et al., 2016) (voir chapitre IV.2.2).

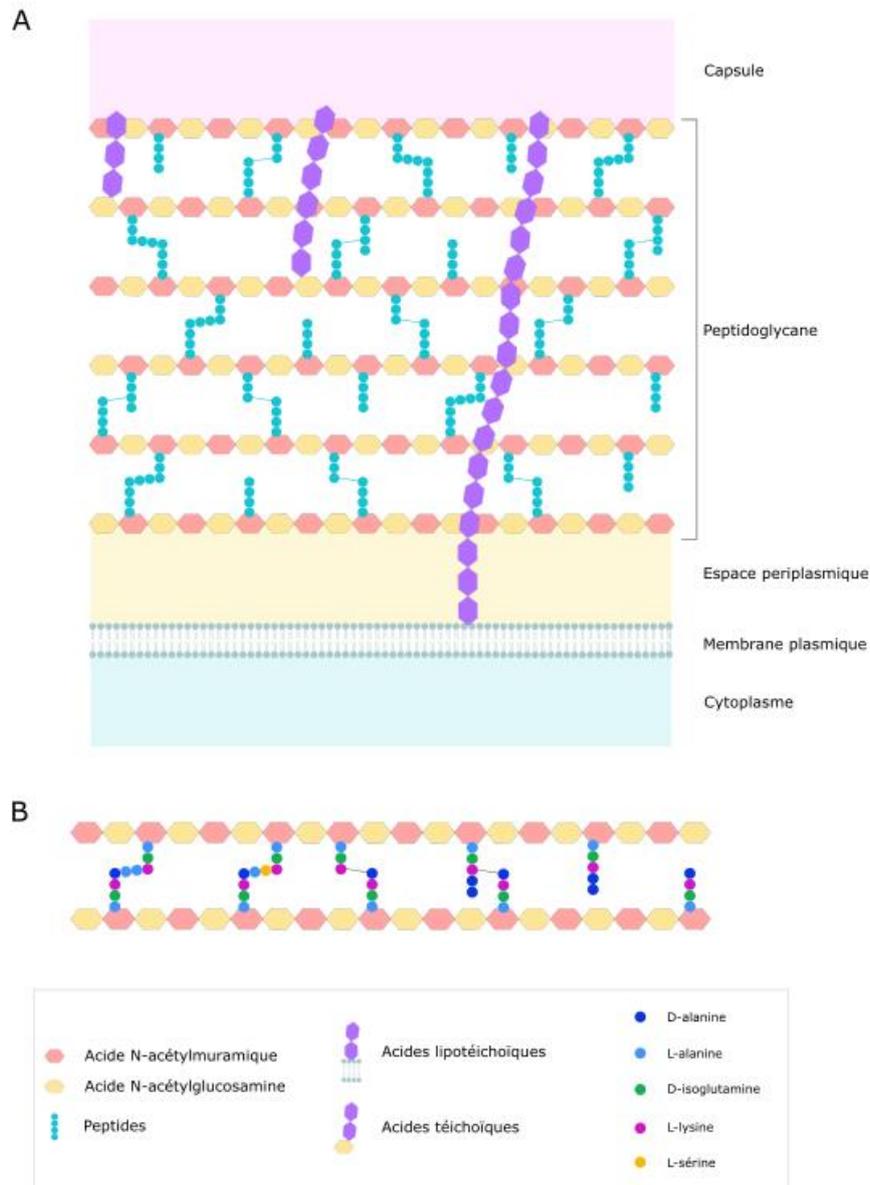


Figure 15 : A) Organisation de l'enveloppe des bactéries à Gram positif. Les hexagones jaunes et oranges représentent respectivement les acides N-acétylglucosamine et N-acétylmuramique. Sur les acides N-acétylmuramique sont fixés les peptides qui permettent la réticulation, représentés par des cercles bleus. Les hexagones violets représentent les sucres qui composent les acides lipoteichoïques et les acides téichoïques. Les acides lipoteichoïques sont liés à la membrane et les acides téichoïques sont liés au peptidoglycane. B) Composition du peptidoglycane de *S. pneumoniae*. Les chaînes polysaccharidiques, composées de répétitions d'acides N-acétylmuramique et N-acétylglucosamine sont réticulées entre elles par des peptides. Ces peptides peuvent être liés entre eux par des liaisons directes ou indirectes, par l'intermédiaire de peptides branchés composés de L-alanine ou de L-sérine.

### III. La paroi cellulaire

Les bactéries à Gram positif se caractérisent par une enveloppe cellulaire complexe composée d'une membrane plasmique, d'un espace périplasmique et d'une épaisse couche de peptidoglycane, le constituant principal de leur paroi cellulaire (Figure 15). Historiquement, le peptidoglycane était considéré comme une structure homogène qui conférait une résistance mécanique uniforme à la cellule (Matias & Beveridge, 2006 ; Beeby et al., 2013 ; Misra et al., 2013). Cependant, des observations récentes au microscope à force atomique ont révélé que la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif ressemble en réalité un hydrogel poreux et hétérogène. En effet, elle se compose de larges pores et de brins de peptidoglycane épais à l'extérieur, tandis que les pores deviennent plus étroits et les brins plus fins en s'approchant de la couche interne de peptidoglycane (Pasquina-Lemonche et al., 2020). Cette nouvelle description de la structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif ouvre de nouvelles perspectives sur sa fonction, ses propriétés mécaniques et son mode d'assemblage.

#### 1) Composition de la paroi

##### 1.1) Le peptidoglycane

Le peptidoglycane, également connu sous le nom de muréine, est un composant essentiel de la paroi cellulaire des bactéries. Il s'agit d'un polymère extracytoplasmique composé de glycanes et de peptides (Figure 15). Le précurseur, appelé lipide II (Figure 16), est synthétisé à partir de glucose à l'intérieur de la cellule. Il subit ensuite des modifications par un enchaînement de réactions enzymatiques et est transporté à travers la membrane. Alors qu'il a longtemps été suggéré que la protéine FtsW et RodA soient des flippases responsables de ce transport à travers la membrane, des études plus récentes ont identifié la protéine MurJ comme une flippase du lipide II (Ruiz et al., 2008 ; Ruiz et al., 2015 ; Sham et al., 2014 ; Kumar et al., 2022). La description complète de la voie de synthèse du lipide II est présentée dans la Figure 16.

Les chaînes de glycanes, sont formées d'une alternance de deux sucres, l'acide N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique (GlcNAc-MurNAc), reliés par des liaisons glycosidiques. Pour former un réseau tridimensionnel, les chaînes de glycanes sont liées

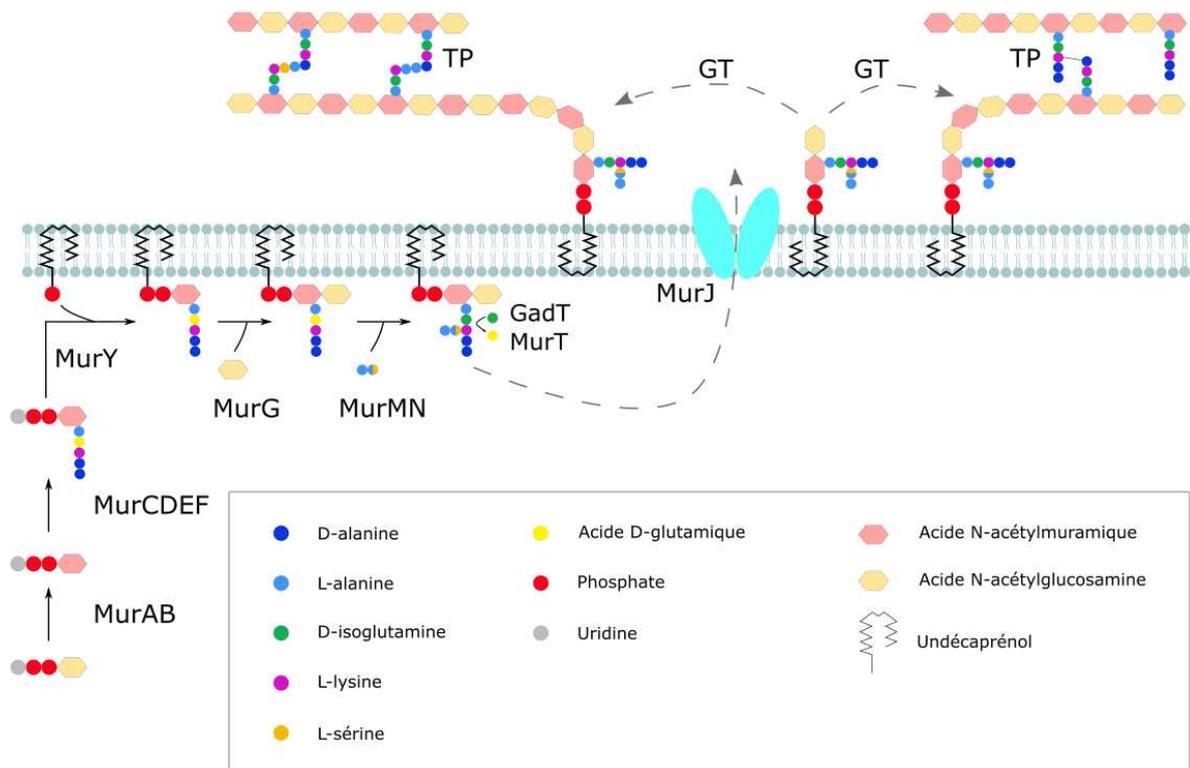


Figure 16 : Synthèse du peptidoglycane de *S. pneumoniae*. Une série de réactions permet de synthétiser le précurseur du peptidoglycane, le lipide II. Celui-ci est synthétisé dans le cytoplasme et transféré dans le milieu extracellulaire par la flippase MurJ. Il est ainsi intégré au peptidoglycane existant par des réactions de transglycosylation (GT) catalysées par les SEDS et les aPBPs. Les réactions de transpeptidation (TP) sont catalysées par les PBPs de classe A et de classe B. Les PBPs et SEDS (voir chapitre III.2) ne sont pas représentées sur ce schéma. D'après (Ducret & Grangeasse, 2021).

entre elles par des ponts peptidiques. Ces ponts peptidiques sont composés de courtes chaînes d'acides aminés (de conformations L ou D) et sont liés à l'acide N-acétylmuramique par l'une de leurs extrémités. Il convient de noter que la composition des pentapeptides liés au MurNAc varie parmi les différentes espèces bactériennes, surtout les acides-aminés en deuxième et troisième position (Vollmer et al., 2008a). Chez le pneumocoque, le pentapeptide possède la composition suivante : Nterm-L-alanine-D-isoglutamine-L-lysine-D-alanine-D-alanine-Cterm. Ces acides-aminés peuvent être hydrolysés par des enzymes spécifiques. Plus particulièrement, les deux derniers acides aminés (D-Ala-D-Ala) peuvent être hydrolysés pour réguler la réticulation du peptidoglycane (voir chapitre III.2.3).

Contrairement à la plupart des acides aminés des protéines qui adoptent une conformation L, la conformation miroir D confère une résistance aux protéases, ce qui contribue à l'intégrité de la paroi cellulaire. La liaison peptidique entre deux peptides adjacents dans le peptidoglycane peut être réalisée directement entre la D-alanine en position 4 et la L-lysine en position 3, ou de manière indirecte via des peptides dits branchés. Les acides aminés qui permettent de former les peptides branchés sont additionnés par les enzymes MurM et MurN. MurM ajoute une L-sérine ou une L-alanine sur la lysine en position 3 du pentapeptide et MurN ajoute une L-alanine sur le premier acide aminé ajouté par MurM. En absence de ces deux protéines, le peptidoglycane est réticulé uniquement par des liaisons directes (Filipe et al., 2000 ; Fiser et al., 2003). Ces peptides branchés ou linéaires sont ensuite utilisés comme substrats par certaines PBPs dite de classe B (voir chapitre III.2.2) au cours de la polymérisation pour former des liaisons peptidiques branchées ou directes.

Ces liaisons peptidiques permettent de réticuler les chaînes de sucre, créant ainsi un réseau tridimensionnel autour de la cellule bactérienne.

Enfin, le peptidoglycane peut être modifié par l'ajout ou la suppression de résidus acétyl (Vollmer & Tomasz, 2000 ; Cristóstomo et al., 2006 ; Vollmer, 2008 ; Moynihan & Clarke, 2010). Ces modifications comprennent la O-acétylation du NAM et la N-acétylation du NAG (Vollmer et al., 2019). La O-acétylation, catalysée par l'enzyme Adr, confère une résistance au lysozyme et à l'hydrolase LytA (Bera et al., 2005 ; Bonnet et al., 2017). La déacétylation de NAG par l'enzyme PgdA entraîne une augmentation de la charge positive à la surface de la bactérie, offrant ainsi une protection contre les agents microbiens cationiques (Vollmer &



Tomasz, 2000 ; Vollmer et al., 2008). Un mutant  $\Delta pgdA$  devient hypersensible au lysozyme en phase stationnaire de croissance, ce qui suggère que PgdA pourrait participer à la virulence du pneumocoque en offrant une protection contre le lysozyme de l'hôte (Vollmer & Tomasz, 2002 ; Vollmer et al., 2019).

## 1.2) Les acides téichoïques

La paroi des bactéries à Gram positif est décorée par des acides téichoïques, qui représentent 40 à 50% du poids de la paroi cellulaire (Armstrong et al., 1959 ; Tomasz, 1967 ; Bui et al., 2012). Ils sont classés en deux catégories, les acides téichoïques muraux (WTA), qui sont liés de manière covalente à l'acide N-acétylmuramique et les acides lipotéichoïques (LTA), qui sont ancrés à la membrane par l'intermédiaire d'une ancre lipidique, le glucosyl-diacylglycerol (Eberhardt et al., 2012 ; Brown et al., 2013). Les acides teichoïques sont composés d'un disaccharide ManNAc-GlcNAc (N-acetylmannosamine-N-acetylglucosamine) qui permet leur liaison au peptidoglycane, ainsi que d'unités de répétition de glycérol-phosphate ou de ribitol-phosphate. Les protéines TaL et LytR sont respectivement impliquées dans l'attachement des LTA et des WTA à la membrane et à la paroi cellulaire (Johnsorg & Havarstein, 2009a ; Ye et al., 2018).

Contrairement aux autres bactéries à Gram positif, les WTA et les LTA de *S. pneumoniae* partagent la même voie de synthèse, ce qui leur confère une composition identique (Fischer, 1990 ; Klein et al., 1996 ; Denapate et al., 2012). Ils sont décorés de phosphoryl-choline (ChoP), ce qui rend le pneumocoque dépendant de l'apport exogène de choline (Tomasz, 1967 ; Fischer, 1997) et sont capables d'interagir avec des protéines présentant des domaines de liaison à la choline (CBPs). Ces protéines ont diverses fonctions et jouent un rôle dans la physiologie du pneumocoque et la virulence (Johnsborg & Håvarstein, 2009 ; Mellroth et al., 2012 ; Stefanovic et al., 2021). Ce sont notamment des hydrolases de la paroi cellulaire impliquées dans l'autolyse du pneumocoque (LytA : Tuomanen & Tomasz, 1990 ; LytC : Garcia et al., 1999), le fratricide (CbpD : Guiral et al., 2005) ainsi que la division cellulaire (LytB). Elles peuvent également être impliquées dans l'adhésion du pneumocoque aux cellules hôtes et la virulence (PcpA : Sanchez-Beato et al., 1998 ; PspC : Rosenow et al., 1997).



Au cours de leur synthèse cytoplasmique, les gènes *lic*, organisés en deux opérons, produisent deux protéines impliquées dans l'import et la métabolisation de la choline, la synthèse des précurseurs aux acides téichoïques et le transport des acides téichoïques décorés de choline à travers la membrane (Hakenbeck et al., 2009).

Les acides teichoïques ont des fonctions diverses dans la cellule ; ils offrent une protection contre les antibiotiques et les phages et jouent un rôle dans l'adhérence et l'infection de la cellule hôte (Wu et al., 2021). Ils sont aussi impliqués dans la division cellulaire. En effet, la délétion du gène codant pour la protéine LytR, responsable de l'attachement des acides teichoïques à la paroi cellulaire, entraîne des défauts cellulaires et perturbe le positionnement du septum de division (Johnsborg & Håvarstein, 2009 ; Ye et al., 2018). Ces observations soulignent l'importance des acides téichoïques dans le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des bactéries à Gram positif.

Le pneumocoque code également pour l'opéron *dlt*, dont les gènes sont impliqués dans la décoration des LTA et des WTA avec des résidus de D-alanine (Kovács et al., 2006). Ces modifications, qui ajoutent des charges positives, augmentent la résistance aux peptides antimicrobiens. Il convient de noter que toutes les souches de pneumocoque ne présentent pas cette modification. Par exemple, elle est présente chez la souche D39 mais absente chez la souche TIGR4, en raison de modifications dans l'opéron qui le rendent non fonctionnel (Vollmer et al., 2019).

## 2) Synthèse du peptidoglycane

Un grand nombre de protéines sont impliquées dans la synthèse et l'hydrolyse de la paroi cellulaire pendant la division cellulaire. La structure maillée de la paroi cellulaire est le résultat de la polymérisation des disaccharides en chaînes de glycane, un processus catalysé par des enzymes dotées d'une activité glycosyltransférase (GTase). De plus, des enzymes dotées d'une activité transpeptidase (TPase) assurent la liaison covalente des chaînes de glycane à leur pentapeptide (Vollmer et al., 2008 ; Lovering et al., 2012). Je détaillerai ci-dessous les différents acteurs de la synthèse du peptidoglycane.



### 2.1) Les SEDS

Les SEDS (Shape, elongation, division, sporulation) participent à la synthèse de la paroi cellulaire (Meeske et al., 2016). Ce sont des protéines membranaires intégrales avec 10 segments transmembranaires (Gerard et al., 2002). Initialement identifiées comme des flippases, les SEDS ont récemment été caractérisées comme des glycosyltransférases, bien que leur rôle de flippase ne soit pas totalement exclu (Mohammadi et al., 2011 ; Meeske et al., 2016 ; Emami et al., 2017 ; Taguchi et al., 2019). Les SEDS fonctionnent de pair avec des protéines de liaison à la pénicilline, ou PBPs (Penicillin-binding proteins) monofonctionnelles qui ont une activité transpeptidase (Straume et al., 2021) (voir chapitre III.2.2). Bien que les SEDS soient impliquées dans la synthèse du peptidoglycane, ma présentation se concentrera davantage sur les Penicillin-binding proteins (protéines de liaison à la pénicilline) et leurs régulateurs.

### 2.2) Les PBPs

Les protéines de liaison à la pénicilline, également connues sous le nom de PBPs (penicillin-binding proteins), sont impliquées dans la synthèse et le remodelage du peptidoglycane. Elles sont classées en trois catégories distinctes : A, B et C (Sauvage et al., 2008). Les PBPs de classe A et B sont des PBPs de haut poids moléculaire (HMW PBPs) impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. Les PBPs de classe A (aPBPs) catalysent à la fois les réactions de transglycosylation et de transpeptidation. En revanche, les PBPs de classe B (bPBPs) sont monofonctionnelles et ne possèdent que l'activité transpeptidase (Figure 17).

Les PBPs de classe C sont des PBPs de bas poids moléculaire (LMW PBPs). Elles seraient impliquées dans le remodelage du peptidoglycane (Sauvage et al., 2008 ; Sauvage et al., 2016 ; van Heijenoort, 2011). Les PBPs de classe C (cPBPs) sont des hydrolases avec une activité de D,D-carboxypeptidase ou d'endopeptidase. Elles régulent le degré de réticulation du peptidoglycane en éliminant l'acide aminé terminal (D-Ala) des chaînes de pentapeptide (Hakenbeck & Kohiyama, 1982 ; Morlot et al., 2005).



- Les PBPs de classe B

*S. pneumoniae* possède deux bPBPs essentielles, PBP2x et PBP2b, qui sont respectivement impliquées dans la synthèse septale et périphérique du peptidoglycane (Tsui et al., 2014 ; Berg et al., 2013).

Elles sont composées d'une queue cytoplasmique N-terminale, d'une hélice transmembranaire et d'un ou deux domaines extracytoplasmiques portant l'activité transpeptidase (Sauvage et al., 2008 ; Sauvage et al., 2016). PBP2x présente également deux domaines PASTA (PBP and serine/threonine kinase-associated) (voir chapitre IV.1.3) en C-terminal, qui sont nécessaires pour sa localisation septale (Peters et al., 2014).

La déplétion de PBP2x induit l'allongement des cellules, tandis que la déplétion de PBP2b les rend plus courtes. PBP2x et PBP2b forment un complexe avec une glycosyltransférase de la famille des SEDS, respectivement avec FtsW et RodA (Gérard et al., 2002 ; Fraipont et al., 2011 ; Zapun et al., 2012 ; Sjodt et al., 2018, 2020).

Le complexe FtsW-PBP2x migre circonférentiellement autour de l'anneau Z, induisant l'invagination de la paroi entre les cellules filles et assurant ainsi la synthèse septale. D'autre part, le complexe RodA-PBP2b présente un mouvement indépendant du *treadmilling* de FtsZ et serait responsable de la synthèse périphérique du peptidoglycane (Berg et al., 2014 ; Tsui et al., 2014 ; Perez et al., 2019). Ces complexes impliqués dans la synthèse du peptidoglycane illustreraient la présence de deux machineries, septale et périphérique. Les protéines responsables de la synthèse du peptidoglycane se séparent en deux anneaux concentriques (Perez et al., 2021b). Certaines se localisent dans la partie interne de l'anneau en constriction, notamment la machinerie septale comprenant FtsZ, FtsW et PBP2x, tandis que d'autres protéines restent dans la partie externe de l'anneau, notamment la machinerie périphérique comprenant FtsEX PBP2b et RodA (Perez et al., 2021b).

- Les PBPs de classe A

Les PBPs de classe A sont aussi impliquées dans la synthèse et la réparation du peptidoglycane (Straume et al., 2021). Le pneumocoque code pour trois aPBPs non essentielles ; PBP1a, PBP1b et PBP2a, et la délétion de PBP1a ou PBP2a entraîne des défauts morphologiques importants. En revanche, l'inactivation simultanée de PBP1a et PBP2a n'est pas viable, suggérant que ces deux enzymes partagent des fonctions redondantes et



essentielles à la synthèse de la paroi cellulaire (Paik et al., 1999). Les aPBPs joueraient un double rôle, à la fois dans la synthèse et le remodelage du peptidoglycane mais également dans la réparation de la paroi cellulaire endommagée lors d'un stress (Pazos & Vollmer, 2021 ; Straume et al., 2021). Ces deux fonctions de synthèse et de réparation ne s'excluent pas mutuellement. Une hypothèse récemment soulevée suggère que les aPBPs pourraient agir en collaboration avec les bPBPs-SEDS lors de la synthèse de la paroi, formant ainsi une couche interne de peptidoglycane caractérisée par un maillage plus dense et des brins orientés de manière aléatoire (Straume et al., 2021). Cette hypothèse est étayée par les observations récentes de la paroi cellulaire réalisées au microscope à force atomique (Pasquina-Lemonche et al., 2020).

Étant donné que les PBPs de classe A et de classe B possèdent des activités différentes, il est possible que le peptidoglycane produit par ces dernières diffère dans leur composition et/ou leur architecture. Cette hypothèse est soutenue par des travaux récents ayant montré que l'hydrolase CbpD est capable d'hydrolyser le peptidoglycane synthétisé par PBP2x/FtsW mais pas celui synthétisé par les PBPs de classe A (Straume et al., 2020). De plus, le peptidoglycane produit par FtsW/PBP2x est mûri par les aPBPs en un peptidoglycane résistant à CbpD. Ce processus de maturation est essentiel en présence de CbpD (Straume et al., 2020).

### 2.3) Les régulateurs des PBPs

L'activité des PBPs est régulée par d'autres protéines, comme démontré initialement chez *Escherichia coli*. Par exemple, la lipoprotéine LpoA est capable d'interagir avec la PBP de classe A PBP1A pour stimuler son activité TPase (Paradis-Bleau et al., 2010 ; Typas et al., 2010 ; Lupoli et al., 2014). Il existe également des mécanismes de régulation plus complexes qui impliquent plusieurs régulateurs. En effet, plusieurs protéines sont connues pour réguler l'activité de la PBP de classe A PBP1B. LpoB stimule les activités TPase et GTase de PBP1B (Paradis-Bleau et al., 2010 ; Typas et al., 2010 ; Lupoli et al., 2014 ; Egan et al., 2014 ; Egan et al., 2018). D'autre part, la protéine essentielle FtsN régule l'activité de PBP1B en stimulant son activité GTase (Muller et al., 2007 ; Boes et al., 2019 ; Boes et al., 2020 ; Lyu et al., 2022). Enfin, FtsBL a également été montré pour inhiber l'activité de PBP1B, (Boes et al., 2019). A partir de là, Un défaut de répression par FtsBL ou de dérégulation par FtsN entraîne un

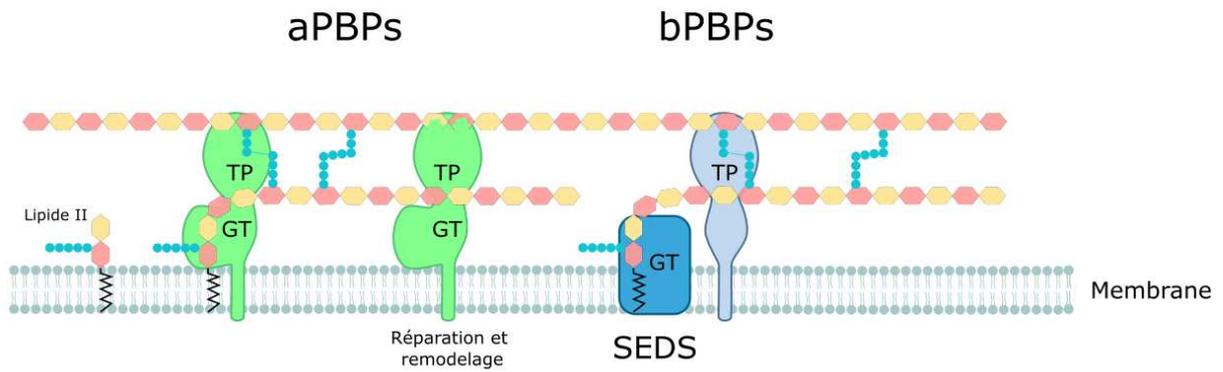


Figure 17 : Activités des PBPs de classe A et B. Les PBPs de classe A (en vert) ont une activité de TPase (transpeptidase) et de GTase (glycosyltransférase). Elles ont une fonction de synthèse du peptidoglycane mais également une fonction de réparation et de remodelage. Les PBPs de classe B (en bleu) ont uniquement une activité de TPase et fonctionnent avec une protéine SEDS qui possède l'activité GTase.

dysfonctionnement du divisome, des défauts de morphogénèse et une lyse cellulaire (Boes et al., 2019).

Plusieurs régulateurs des protéines de liaison aux pénicillines (PBPs) ont également été identifiés chez *Streptococcus pneumoniae*, que je vais décrire ci-dessous (Figure 18).

- CozEa – CozEb

Les protéines CozE (Coordinator of zonal elongation) sont largement représentées au sein des espèces bactériennes et sont divisées en trois familles distinctes : CozEa, CozEb et CozEc. Chez le pneumocoque, on retrouve deux protéines, CozEa et CozEb, couramment retrouvées chez les Streptococaccae (Stamsås et al., 2020). CozEa a été identifiée par criblage TnSeq comme un régulateur de PBP1a. Les mutants de délétion de *cozEa* présentent des défauts morphologiques sévères qui entraînent la lyse des cellules. CozEa interagit avec PBP1a et contribue à sa localisation cellulaire (Fenton et al., 2017). Cependant, le rôle de CozEa a été remis en question par une étude récente. En effet, dans les conditions testées par les auteurs (Lamanna et al., 2022), la délétion de *pbp1a* n'améliorait pas la croissance d'une souche dépourvue de CozEa. De plus, aucune relation de synthèse viabilité n'a été mise en évidence par leurs expériences de Tn-seq (Lamanna et al., 2022). Ces observations récentes questionnent donc la fonction de CozEa, qui reste encore à élucider.

Un homologue de CozEa, appelé CozeB, a été identifié chez le pneumocoque (Stamsas et al., 2020). CozEb est très dynamique et se localise sur l'ensemble du corps cellulaire. Il peut également s'accumuler au niveau du septum, où il s'assemble et se désassemble rapidement (Jana et al., 2023). Un mutant  $\Delta cozEb$  présente des cellules plus petites, mais la localisation de PBP1a n'est pas affectée, contrairement à ce qui a été observé dans un mutant  $\Delta cozEa$  (Stamsås et al., 2020).

- MacP

La délétion simultanée de *pbp1a* et de *pbp2a* étant létale pour le pneumocoque, l'identification de gènes synthétiquement létaux avec *pbp1a* permet de caractériser les gènes codant pour des facteurs favorisant l'activité de PBP2a. C'est ainsi que la protéine MacP (Membrane-anchored cofactor of PBP2a) a été identifiée. MacP devient essentielle en absence de PBP1a, suggérant un lien fonctionnel entre MacP et PBP2a

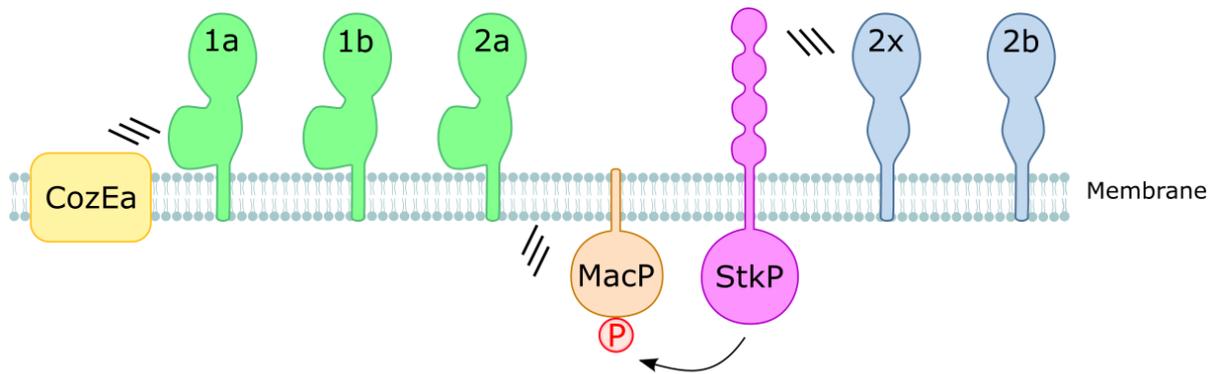


Figure 18 : Les régulateurs connus des PBPs de *S. pneumoniae*. CozEa, MacP et StkP régulent respectivement PBP1a, PBP2a et PBP2x. D'après (Manuse et al., 2018).

(Paik et al., 1999 ; Fenton et al., 2018). MacP forme un complexe avec PBP2a au site de division et est nécessaire à sa fonction *in vivo*. De plus, MacP est phosphorylée par StkP, la sérine-thréonine protéine-kinase régulant la division cellulaire et la morphogénèse du pneumocoque (voir ci-dessous et chapitre IV.2.2).

- StkP

La sérine/thréonine protéine-kinase StkP exerce également une fonction régulatrice au niveau de la PBP de classe B PBP2x. PBP2x et StkP se localisent au site de division et interagissent via leurs régions extracellulaires. L'absence du domaine extracellulaire de StkP entraîne une localisation diffuse de PBP2x dans la membrane. Cependant, il est important de noter que StkP ne semble pas d'effet direct sur l'activité de PBP2x. Ainsi la localisation de PBP2x au site de division dépend du domaine extracellulaire de StkP (Morlot et al., 2013).

A ce jour, aucun régulateur n'a été identifié pour les autres PBPs. Cependant, une étude récente a révélé une relation de synthèse viabilité entre PBP1b et la protéine RodZ lors d'un criblage TnSeq. Les résultats suggèrent que RodZ pourrait jouer un rôle de régulateur pour PBP1b, bien que cette fonction reste à être pleinement élucidée (Lamanna et al., 2022). D'autre part, un nouveau régulateur de PBP2A (l'homologue de PBP2b chez le pneumocoque) a été récemment identifié chez *B. subtilis*. Ce régulateur, nommé TseB, contrôle la morphogénèse de la bactérie. La délétion du gène codant pour TseB entraîne la formation de cellules plus larges et plus longues (Delisle et al., 2021). Au cours de ma thèse, j'ai identifié un nouveau régulateur appelé CopD (Coordinator of PBP1a and PBP2b dynamics), homologue de TseB chez *B. subtilis*. Les détails sur le rôle spécifique de ce régulateur seront exposés dans la section des résultats de mon manuscrit. Ces découvertes ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension des mécanismes de régulation des différentes PBPs.

### 2.3) Les hydrolases

Les hydrolases de la paroi cellulaire contribuent à la plasticité du peptidoglycane, indispensable à la croissance cellulaire. Ces enzymes forment un groupe étendu et diversifié, comprenant des glycosidases ou des amidases, qui clivent spécifiquement les liaisons

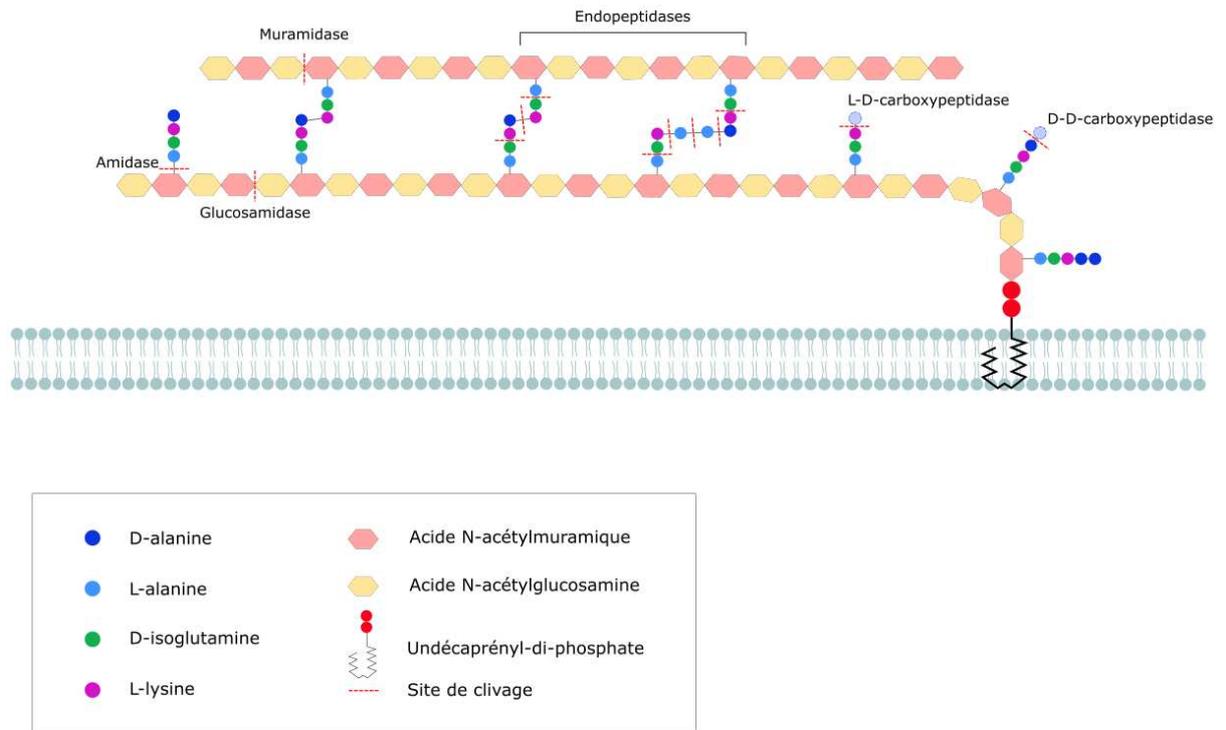


Figure 19 : Fonctionnement des hydrolases de la paroi cellulaire. Les sites de clivage sont représentés par un trait pointillé rouge. D'après (Ducret & Grangeasse, 2021).

glycosidiques, amides ou peptidiques du peptidoglycane. Les hydrolases sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la maturation du peptidoglycane, son recyclage et le clivage du septum lors de la division cellulaire (Wyckoff et al., 2012 ; Lee & Huang, 2013). Par ailleurs, les produits de dégradation du peptidoglycane sont des activateurs critiques du système immunitaire des hôtes (Wolf et al., 2016). Le pneumocoque possède un ensemble de gènes codant pour des nombreuses hydrolases. De plus, les DD-carboxypeptidases jouent également un rôle fondamental dans la synthèse de la paroi cellulaire en catalysant l'élimination de la D-alanine située en position C-terminale, ce qui est essentiel pour la formation de ponts peptidiques. Je présenterai dans cet exposé quelques-unes de ces hydrolases qui présentent une importance particulière pour la division cellulaire du pneumocoque (Figure 19).

- DacA

DacA, aussi nommée PBP3, est l'unique PBP de bas poids moléculaire du pneumocoque. DacA n'a pas d'activité glycosyltransférase ou transpeptidase mais une activité D,D-carboxypeptidase qui lui permet de cliver le résidu D-Alanine terminal du pentapeptide, générant ainsi des tetrapeptides (Hakenbeck et al., 1982). A la différence des PBPs de haut poids moléculaire, PBP3 ne possède pas de région cytoplasmique. C'est une enzyme extracellulaire associée à la membrane par une hélice amphipathique C-terminale (Morlot et al., 2005). La délétion du gène codant pour PBP3 entraîne des défauts morphologiques importants avec des défauts de formation du septum de division et des défauts de séparation des cellules (Schuster et al., 1990 ; Morlot et al., 2004). Les tetrapeptides générés par l'action de DacA ne peuvent pas être utilisés par les PBPs de haut poids moléculaire pour la transpeptidation, limitant ainsi la disponibilité du substrat nécessaire à la réticulation de la paroi cellulaire (Morlot et al., 2004 ; Abdullah et al., 2014).

- DacB

DacB est une L,D-carboxypeptidase qui agit en aval de DacA. Elle clive les tetrapeptides produits par DacA ou par les PBPs lors de la réaction de transpeptidation. Elle clive la D-Ala en position 4 pour former des tripeptides (Zhang et al., 2015 ; Vollmer et al., 2019). DacB se

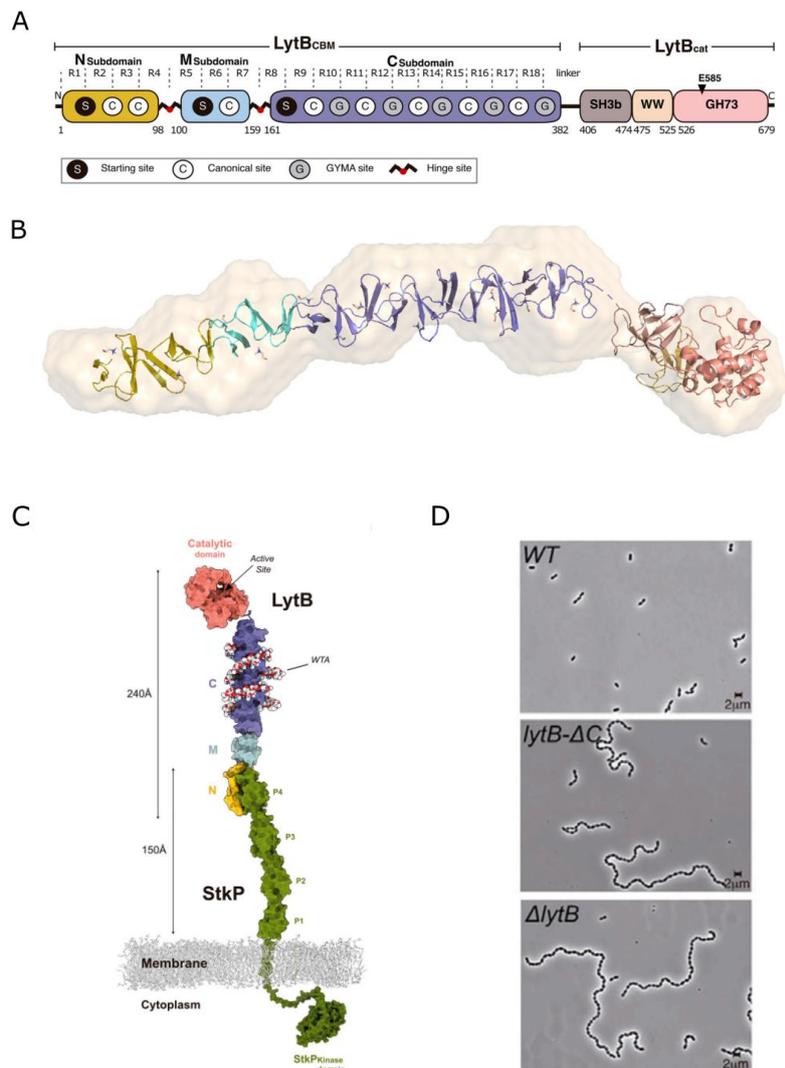


Figure 20 : A) Représentation schématique des modules de LytB. Les 18 répétitions (R1-R18) composant le module d'interaction avec la choline de LytB sont représentés. B) Superposition de l'enveloppe de LytB initialement déterminée par SAXS avec la structure obtenue par cristallographie. Les différentes régions sont représentées en suivant le code couleur de la figure A) et l'enveloppe est colorée en orange clair. C) Images de microscopie en contraste de phase de la souche WT,  $\Delta lytB$  et  $lytB-\Delta C$  (mutant délété du sous-domaine C). D) Modèle de l'interaction entre LytB, StkP et les acides téichoïques. Le sous-domaine C assure l'interaction entre LytB et la paroi cellulaire en s'entourant de WTA ornés de phosphorylcholine. Les sous-domaines N et M assurent la localisation de LytB au site de division via l'interaction avec le PASTA 4 de StkP. Avec cette organisation, le domaine catalytique de LytB peut être séquestré jusqu'à 400 Å de la surface membranaire. Le modèle de StkP a été généré avec AlphaFold2. (Martínez-Caballero et al., 2023).

compose d'un ancrage lipidique, d'une région désordonnée et un domaine catalytique peptidase C-terminal (Abdullah et al., 2014). La suppression du gène codant pour DacA ou DacB entraîne des défauts morphologiques et de septation (Barendt et al., 2011). Ces résultats soulignent l'importance de la disponibilité des pentapeptides et des tetrapeptides pour l'assemblage et le remodelage de la paroi cellulaire.

- LytB

LytB est une endo- $\beta$ -N-acétylglucosaminidase non autolytique essentielle à la séparation finale des cellules filles (Garcia et al., 1999 ; Rico-Lastres et al., 2015). Elle se localise aux pôles des cellules et est enrichie au niveau du site actif de division (De las Rivas et al., 2002). LytB est sécrétée dans le milieu extracellulaire où elle exerce son activité enzymatique. Elle catalyse spécifiquement le clivage des liaisons glycosidiques  $\beta(1-4)$  entre les résidus GlcNAc et MurNAc, mais uniquement lorsque le GlcNAc est N-acétylé (Rico-Lastres et al., 2015). La structure cristallographique du domaine catalytique de LytB révèle une organisation comprenant un module GH73, situé à l'extrémité C-terminale, responsable de l'activité enzymatique de LytB (Bai et al., 2014). En plus de ce module, LytB présente un module liant la choline (CBM) d'une longueur exceptionnelle (Galán-Bartual et al., 2015). Le CBM se divise en trois sous-domaines, N (pour N-terminal), M (pour milieu) et C (pour C-terminal) qui contiennent des combinaisons de quatre types différents de sites liant la choline, appelés sites de fixation de choline canonique (Canonical), GYMA (contenant le motif Gly-Tyr-Met-Ala), charnière (Hinge) et initial (Starting). (Martínez-Caballero et al., 2023). Cette organisation modulaire confère à LytB une grande flexibilité et lui permet d'interagir avec différents composants de la paroi cellulaire, notamment les cholines des acides téichoïques (Figure 20).

La délétion du gène *lytB* entraîne la formation de chaînes cellulaires, qui peuvent être séparées par l'ajout de LytB exogène (De Las Rivas et al., 2002). La délétion du sous-domaine C conduit à un phénotype similaire, ce qui indique que ce sous domaine est essentiel à la fonction de LytB. Le sous-domaine C, en interagissant avec les WTA, permet à LytB de se lier efficacement à la paroi cellulaire (Martínez-Caballero et al., 2023). Le sous-domaine N-terminal interagit quant à lui avec StkP via son domaine extracellulaire. Cette interaction est nécessaire à la localisation spatio-temporelle de LytB (Zucchini et al., 2018 ;

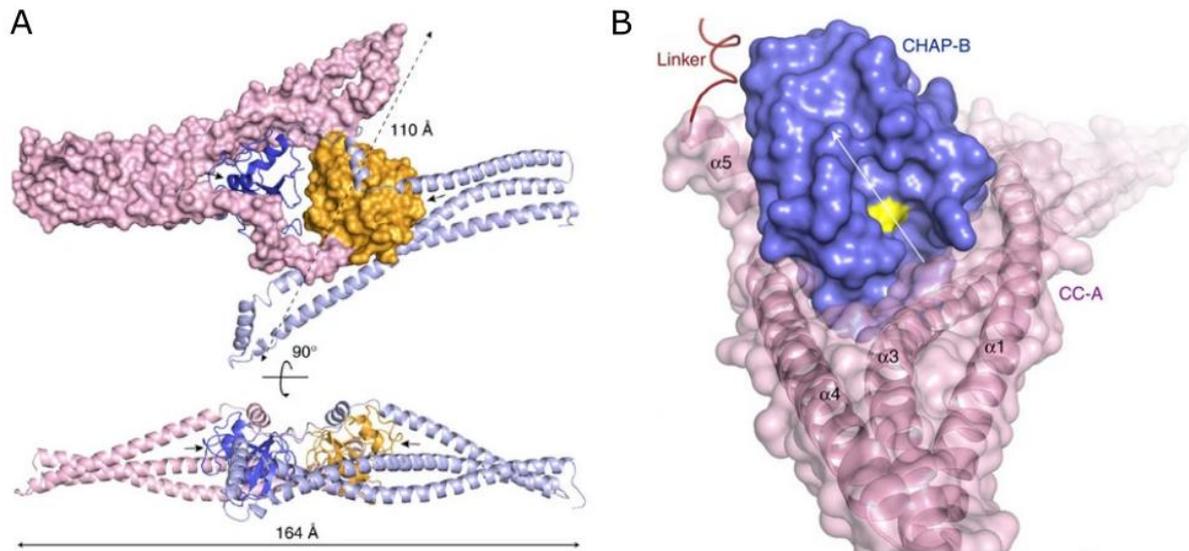


Figure 21 : Structure cristallographique des dimères de PcsB. A) La surface moléculaire du monomère A est représentée en rose (domaine CC) et en orange (domaine catalytique). La structure en rubans du monomère B est représentée en bleu clair (domaine CC) et en bleu foncé (domaine catalytique). B) Interaction du domaine CC du monomère A (CC-A) et du domaine CHAP du monomère B (CHAP-B). La cystéine 292 catalytique est colorée en jaune. D'après (Bartual et al., 2014).

Martínez-Caballero et al., 2023). LytB est également requise pour la formation de biofilms *in vitro* (Domenech & Garcia, 2020). Cette fonction supplémentaire souligne le rôle polyvalent de LytB dans les processus cellulaires et son importance dans la physiologie du pneumocoque.

- PcsB

PcsB est une DL-endopeptidase (ou amidase) qui se localise au site actif de division (Sham et al., 2011). Elle est essentielle au remodelage du peptidoglycane au niveau de la région septale pendant la division cellulaire (Ng et al., 2004).

Un mutant de déplétion du gène *pcsB* présente des cellules en chaînes, linéaires ou sous forme de grappe, parfaitement septées mais non séparées. Cela conduit, au cours des générations suivantes, à la synthèse d'une paroi septale avec une localisation anormale et entraîne donc l'apparition de défauts morphologiques sévères. Par conséquent, PcsB joue un rôle crucial dans la séparation des cellules filles et dans l'orientation spatiale de la formation du septum (Bartual et al., 2014).

*In vivo*, l'activation de PcsB est médiée par le complexe FtsEX, qui est le principal régulateur de son activité au cours de la division cellulaire (voir chapitre I.1.2) (Sham et al., 2011 ; Sham et al., 2013). Le site actif de PcsB se trouve proche de la région C-terminale et appartient à la famille des endopeptidases CHAP (Cysteine, histidine-dependent amidohydrolase/peptidase). La structure cristallographique révèle un homodimère inactif dans lequel le domaine coiled-coil de chaque monomère s'insère dans le site actif de l'autre (Figure 21) (Bartual et al., 2014).

- MpgA et MpgB

MpgA et MpgB, initialement nommées MltG et Pmp23, sont des muramidases qui clivent le peptidoglycane naissant, à différentes positions le long de la chaîne glycane (Taguchi et al., 2021). MpgA produit des oligomères de peptidoglycane composés de 7 unités disaccharidiques, tandis que MpgB clive à une unité disaccharidique (Figure 22). Cette différence s'explique par la présence d'un domaine LysM dans MpgA, qui sert de socle et permet la formation d'oligosaccharides plus longs. Ce domaine LysM est nécessaire à la pleine fonctionnalité de la protéine dans les cellules (Taguchi et al., 2021).

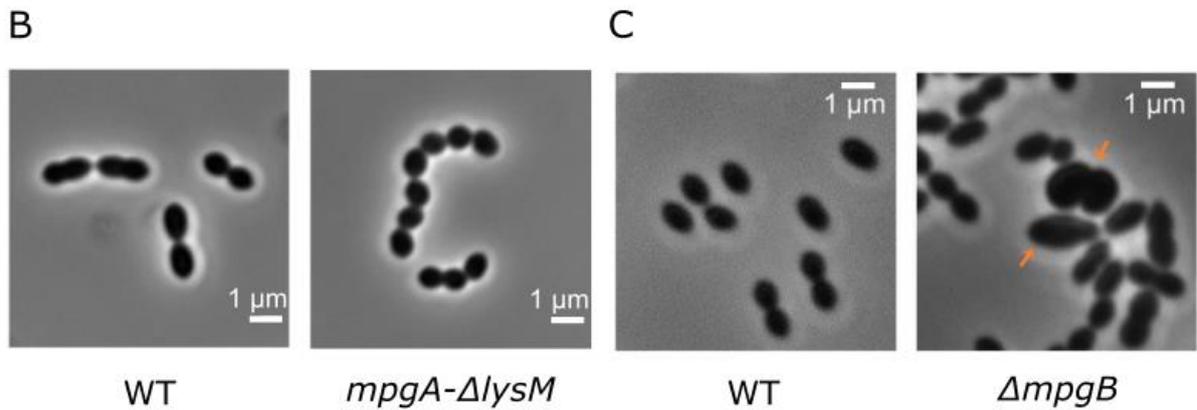
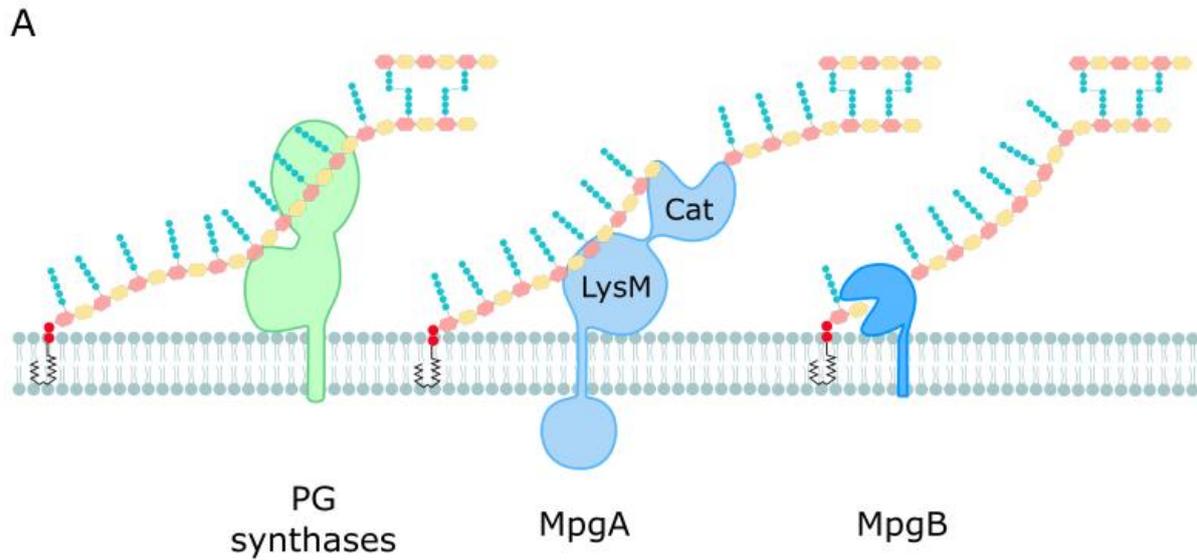


Figure 22 : Modèle de fonctionnement de MpgA et MpgB chez *S. pneumoniae*. Les synthèses du peptidoglycane (en vert) polymérisent le lipide II et intègrent les chaînes de glycane naissantes à la paroi existante. MpgA et MpgB (en bleu clair et bleu foncé) permettent l'intégration des chaînes de glycane en clivant le polymère à différentes distances de l'ancre lipidique. D'après (Taguchi et al., 2021). B) Image de microscopie optique de cellules wild type et *mpgA-ΔlysM* (Taguchi et al., 2021). C) Image de microscopie optique de cellules wild type et *ΔmpgB* (Jacq et al., 2018).

MpgA est un homologue de la transglycosylase lytique MltG de *E. coli* (Yunck et al., 2016). Le remplacement d'un seul acide aminé de MltG par l'acide aminé présent dans MpgA modifie l'activité de la transglycosylase en muramidase (Taguchi et al., 2021). De manière intrigante, l'expression ectopique de MltG de *E. coli* compense le phénotype du mutant de



*S. pneumoniae* délété pour *mpgA*, bien que ce dernier ne code pour aucune transglycosylase lytique connue (Tsui et al., 2016 ; Weaver et al., 2023). MpgA est une protéine essentielle. La délétion du gène codant pour MpgA peut néanmoins être réalisée dans une souche dépourvue de PBP1a, PBP2b, MreCD, RodA ou RodZ, des protéines impliquées dans l'élongation cellulaire (Tsui et al., 2016), ce qui suggère que MpgA serait importante pour la synthèse périphérique du peptidoglycane. Cette possibilité est renforcée par la formation de cellules sphériques avec une croissance cellulaire altérée lors de la déplétion de MpgA (Tsui et al., 2016). Les interactions entre MpgA et les synthèses du peptidoglycane n'ont pas encore été explorées, cependant le domaine cytoplasmique de MpgA interagit avec EloR (aussi nommée KhpB ou Jag), qui fait partie d'un complexe associé à l'ARN impliqué dans la régulation de l'élongation cellulaire (Stamsås et al., 2017 ; Winther et al., 2019).

Le pneumocoque code également pour une deuxième muramidase, MpgB, impliquée dans la division cellulaire (Jacq et al., 2018 ; Taguchi et al., 2021). MpgB présente une homologie structurale avec la transglycosylase lytique MltE de *E. coli* et une muramidase de *B. subtilis* qui hydrolyse la liaison glycosydique  $\beta$ -1,4 entre le MurNAc et le GlcNAc (Fukushima et al., 2008 ; Xu et al., 2014). Contrairement à MpgA, la délétion de MpgB n'est pas essentielle, mais elle entraîne une localisation anormale des protéines du divisome et des défauts de septation (Pagliero et al., 2008 ; Jacq et al., 2018).

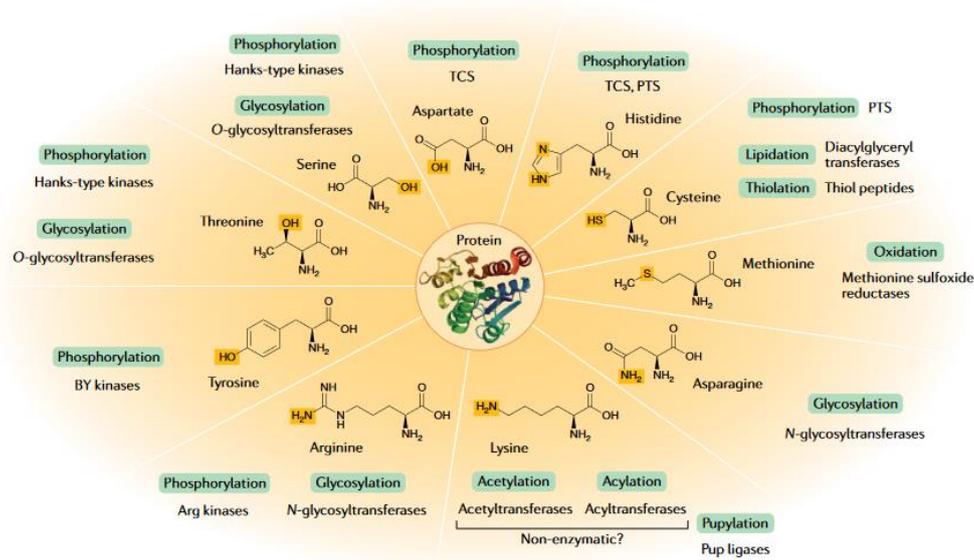


Figure 23 : Les modifications post-traductionnelles des protéines chez les bactéries. De nombreux résidus peuvent subir des modifications. Les groupes réactifs sur les chaînes d'acides aminés sont surlignés en jaune. Pup : protéine procaryote ressemblant à l'ubiquitine ; PTS : système phosphotransférase ; TCS : système à deux composants. (Macek et al., 2019).

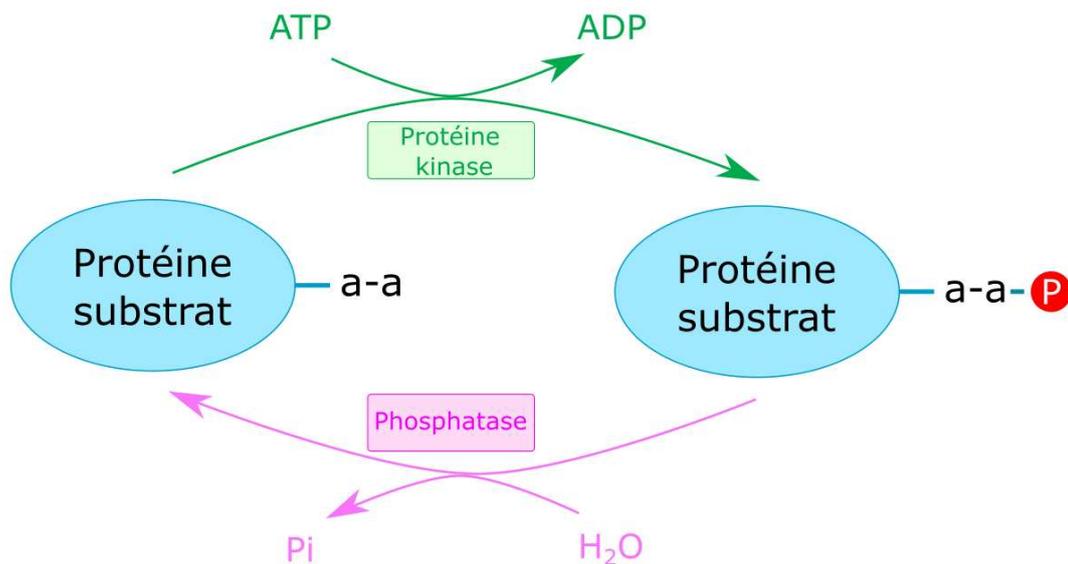


Figure 24 : Le mécanisme de phosphorylation. La protéine kinase (en vert) catalyse l'ajout d'un phosphate (P rouge) sur un acide aminé (a-a) d'une protéine substrat (en bleu). Cette réaction est dépendante de l'ATP. La déphosphorylation est réalisée par une phosphatase (en rose) qui retire le phosphate du substrat. D'après (Patterson et al., 2014).

#### IV. La phosphorylation des protéines bactériennes

Les modifications post-traductionnelles des protéines, ou PTMs (Post-Translational Modifications) sont des mécanismes puissants d'adaptation et de régulation. Ces modifications permettent de moduler les propriétés physico-chimiques, et ainsi la fonction, des protéines ciblées. Chez les bactéries, elles sont notamment impliquées dans la régulation de la synthèse des protéines, le métabolisme central, le cycle cellulaire, dans certains stades de leur développement comme la sporulation, la persistance ou encore la virulence (Macek et al., 2019).

La moitié des 20 acides aminés standards peuvent être modifiés, par l'ajout de petits groupements chimiques, comme les groupes méthyle, acétyle ou phosphate, ou par l'ajout de groupements plus complexes, comme des polysaccharides et des chaînes de polypeptides (Pearce et al., 2008 ; Müller, 2018). Une même protéine peut subir plusieurs modifications post-traductionnelles (van Noort et al., 2012). La plupart des PTMs sont réversibles et dynamiques, pouvant être ajoutées ou retirées par des enzymes spécifiques, telles que les acétyltransférases et les déacétylases pour l'acétylation, ou les protéines ligases ressemblant à ubiquitine (prokaryotic ubiquitin-like protein) et les dépupylases pour la pupylation (Figure 23) (Macek et al., 2019).

Parmi les PTMs, la phosphorylation des protéines est à ce jour la plus étudiée et la mieux comprise (Dworkin et al., 2015 ; Manuse et al., 2016). Elle est caractérisée par le transfert d'un groupe phosphate, généralement provenant de l'ATP, vers un acide aminé spécifique. La phosphorylation des protéines bactériennes a ainsi été détectée sur plusieurs résidus d'acides aminés tels que la sérine, la thréonine, la tyrosine, l'histidine, l'arginine, la lysine, l'aspartate et la cystéine (Mijakovic et al., 2016). Les chaînes latérales phosphorylées peuvent présenter des niveaux de stabilité variés et avoir différents impacts sur les protéines phosphorylées (Macek et al., 2019). Différentes protéine-kinases sont responsables de catalyser cette réaction de phosphorylation, tandis que des phosphatases catalysent la réaction inverse (Figure 24).

Initialement, cette modification a d'abord été décrite grâce à la caractérisation des systèmes à deux composants, qui impliquent une protéine histidine kinase et leurs régulateurs de réponse associés (Stock et al., 2000). D'autres types de protéine-kinases ont ensuite été

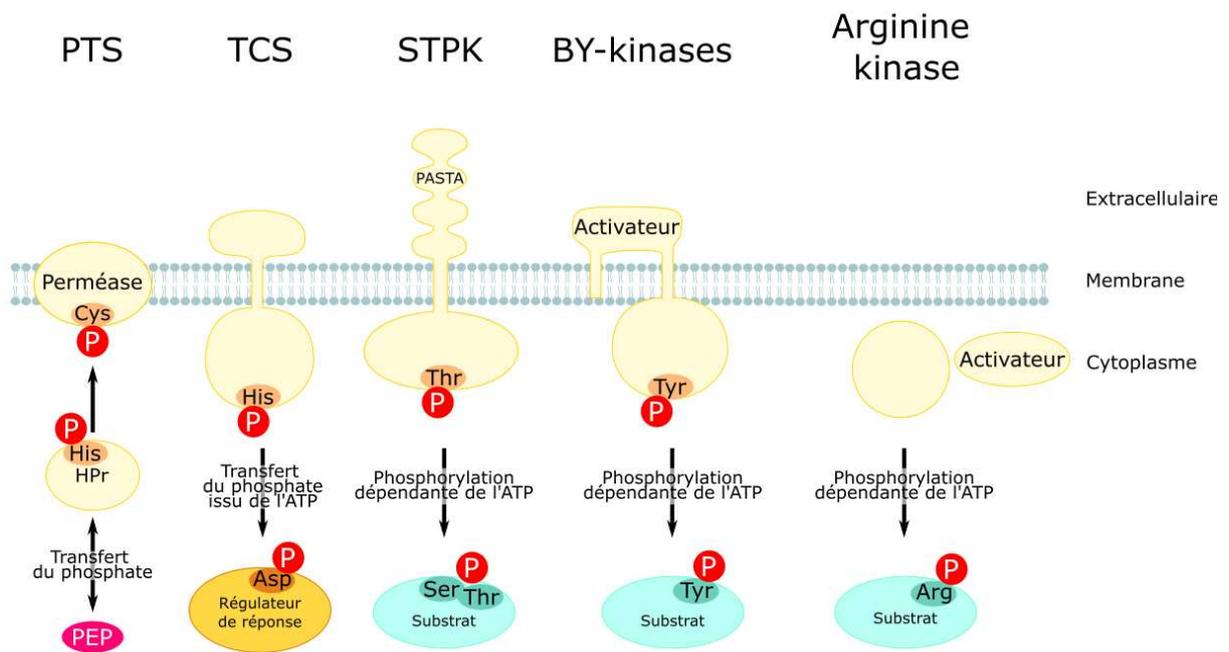


Figure 25 : Les différentes familles de protéine-kinases bactériennes. Dans le système PTS, le transfert d'un phosphate du phosphoénolpyruvate PEP vers une perméase se fait via la phosphorylation de HPr. Le TCS s'autophosphoryle sur une histidine et transfère son phosphate sur l'aspartate d'un régulateur de réponse. Les STPKs et les tyrosine-kinases (BY-kinases) s'autophosphorylent et phosphorylent leurs substrats. Les Arginines kinases sont activées par un(des) activateur(s) et phosphorylent leur substrat. Les acides aminés phosphorylés sont indiqués pour chaque protéine. D'après (Macek et al., 2019).

identifiées dans les génomes bactériens (Olsen & Mann, 2013) (Figure 25). Dans cette partie, je présenterai les différents systèmes de phosphorylation bactériens et je terminerai par une présentation plus détaillée de l'état des connaissances concernant la Serine/thréonine-kinase StkP de *S. pneumoniae*.

## 1) Les protéine-kinases bactériennes

### 1.1) Le système à deux composants

La plus grande famille de protéine-kinases bactériennes est celle des systèmes à deux composants (TCS). Ils sont absents chez les animaux mais sont retrouvés chez certains Eucaryotes comme les plantes, les champignons ou les Archées (Alvarez et al., 2016 ; Ronson et al., 1987).

Les TCS sont des systèmes de transduction de signal linéaires. Ils sont composés de deux protéines : une histidine kinase qui permet de *détecter* des signaux environnementaux. Elle s'autophosphoryle sur une histidine et transfère son phosphate sur l'aspartate d'un régulateur de réponse (Figure 25). Dans la plupart des cas, cela conduit à un changement dans la transcription des gènes (Gross et al., 1989 ; Stock et al., 2000 ; Gómez-Mejía et al., 2018).

Certains TCS impliquent une histidine kinase hybride contenant un domaine histidine kinase (HK), un domaine receveur et un phosphotransmetteur à histidine (HPT). Elle transmet le phosphate à son régulateur de réponse au moyen d'un transfert séquentiel sur quatre acide aminés (His → Asp → His → Asp) (Alvarez et al., 2016). Ce système, appelé phosphorelais, peut aussi impliquer la phosphorylation de protéines intermédiaires, qui portent chacune un domaine signal (Figure 26) (Stock et al., 2000).

Les TCS sont des mécanismes de régulation qui permettent aux bactéries de percevoir et de s'adapter aux changements environnementaux. La plupart des histidines protéine-kinases sont membranaires, et peuvent ainsi détecter des signaux extracellulaires ou transmembranaires, comme des stress de l'enveloppe ou des variations de températures (Mascher et al., 2006). Contrairement aux sérines et thréonines, les phosphorylations sur les aspartates et les histidines sont relativement labiles et ne nécessitent pas toujours une phosphatase (Dworkin, 2015 ; Gómez-Mejía et al., 2018).

Le pneumocoque possède 13 TCS ainsi qu'un régulateur de réponse dit orphelin, RitR, très conservé (Lange et al., 1999 ; Throup et al., 2000). Ces TCS sont notamment impliqués dans

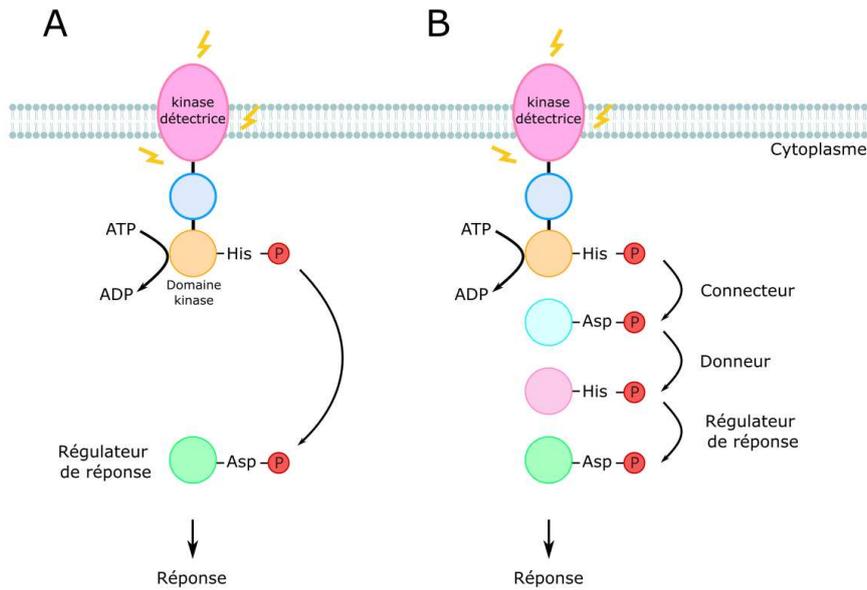


Figure 26 : Organisation du système TCS chez les bactéries. A) Une kinase détectrice (ovale rose) reçoit un signal extracellulaire, membranaire ou cytoplasmique (éclairs jaunes). Elle s'autophosphoryle sur un résidu Histidine de son domaine kinase (cercle orange). Ensuite, le phosphate (Ⓟ rouge) est transféré sur un résidu Aspartate d'un régulateur de réponse (en vert). B) Dans le cas d'un système phosphorelais, le phosphate du résidu Histidine du domaine kinase est transféré sur un résidu Aspartate d'un connecteur (cercle bleu), puis sur un résidu Histidine d'un donneur (cercle rose) avant d'être transféré sur un résidu Aspartate du régulateur de réponse. D'après (Alvarez et al., 2016).

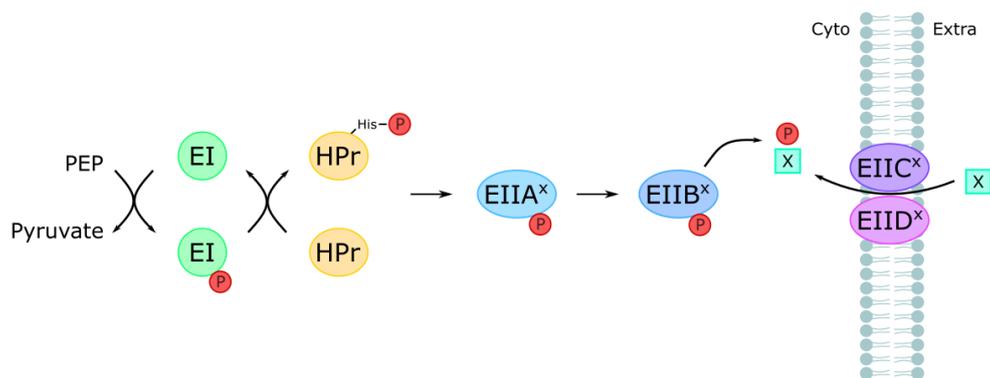


Figure 27 : Organisation du système PTS chez les bactéries. Le phosphate (Ⓟ rouge) du phosphoenolpyruvate (PEP) est transféré sur EI puis sur un résidu Histidine de HPr. Ensuite le phosphate est transféré sur les enzymes EIIA, EIIB, EIIC et EIID spécifiques d'un sucre X (carrés turquoise). Le sucre est transporté dans le cytoplasme par les enzymes EIIC et EIID puis phosphorylé par EIIB. D'après (Deutscher et al., 2014).

la production de bactériocines, la virulence (Paterson et al., 2006 ; Hirschmann et al., 2021 ; Yu et al., 2023), la survie intracellulaire (Reinoso-Vizcaino et al., 2020) ou la résistance aux antibiotiques et aux peptides antimicrobiens (Gómez-Mejia et al., 2018 ; Diagne et al., 2022). Trois TCS, ComDE (TCS12), CiaRH (TCS05), WalRK (TCS02), jouent un rôle dans la mise en place de la compétence du pneumocoque (voir chapitre I.1.3). CiaRH et WalRK sont également spécialisés dans la réponse au stress antibiotique et au stress à la membrane (Ibrahim et al., 2004 ; Cortes et al., 2015 ; Rogers et al., 2007 ; Gutu et al., 2010). TCS03, aussi nommé LiaRS, répond au clivage du peptidoglycane par les hydrolases LytA, CbpD et LytC lors du fratricide pendant la compétence (Eldholm et al., 2010 ; Gómez-Mejia et al., 2018). Le système LiaRS est également impliqué dans la résistance aux antibiotiques (Eldholm et al., 2010).

#### 1.2) Le système phosphoénolpyruvate/sucre phosphotransférase

Le système phosphotransférase (PTS) est impliqué dans le transport de sucres chez les bactéries et les archées (Postma et al., 1993).

Le PTS est généralement composé de quatre protéines solubles et d'une protéine membranaire. Deux des composants cytoplasmiques, l'enzyme I (EI) et HPr sont responsables du transport de la majeure partie des substrats. Le complexe d'enzymes II (EII), soit EIIA, EIIB, EIIC et parfois EIID, sont spécifiques d'un groupe de substrats (Mijakovic & Macek, 2012). Tous les sucres ne sont pas pris en charge par les PTS, c'est le cas du glycerol (un alcool de sucre), du glucuronate et du D-arabinose, qui sont transportés via des ABC transporteurs, des perméases ou des facilitateurs permettant la diffusion passive des sucres (Saier et al., 2002 ; Titgemeyer et al., 2007).

Le PTS est un système de phosphorylation en cascade, sur des résidus histidine, à l'exception de EIIB qui peut être phosphorylée sur des résidus cystéine (Deutscher et al., 2006). La source de phosphate dans cette cascade est le phosphoénol pyruvate. La première étape est l'autophosphorylation de EI. EI transfère son groupement phosphate à l'enzyme HPr qui phosphoryle les enzymes EIIAs. Elles transfèrent ensuite leur phosphate à leurs EIIBs associées. Ces transferts de phosphates à haute énergie sont réversibles. Ensuite, chaque EIIB phosphoryle irréversiblement le sucre lié à la protéine EIID et/ou EIIC. Ce sucre sera libéré dans le cytoplasme (Figure 27) (Deutscher et al., 1997 ; Galinier & Deutscher, 2017).



Les PTS régulent également de nombreuses fonctions cellulaires, par interaction ou phosphorylation de protéines cibles. Ces cibles sont des régulateurs transcriptionnels, des histidines kinases de systèmes TCS, des enzymes cataboliques ou des transporteurs (Joyet et al., 2013).

Les PTS interviennent par exemple dans la régulation de la répression catabolique, le phénomène qui permet aux bactéries de s'adapter à une source de carbone privilégiée (Deutscher et al., 2008). Elles interviennent aussi dans le métabolisme de l'azote, la formation de biofilms, la virulence des pathogènes, etc. (Gallinier and Deutscher, 2017).

A titre d'exemple, le système PTS mannose (Man-PTS) est impliqué dans la régulation globale de l'expression des gènes de virulence du pneumocoque. La structure tridimensionnelle du domaine EIIA du Man-PTS a été résolue, révélant une poche catalytique contenant une histidine essentielle à son activité. Cette découverte ouvre la voie à la recherche de petites molécules inhibitrices, offrant ainsi une stratégie supplémentaire prometteuse pour lutter contre les infections à pneumocoque (Magosh et al., 2020).

### 1.3) Les Sérine/Thréonine protéine-kinases de type Hanks

Les bactéries possèdent également des sérine/thréonine protéine-kinases de type Hanks (STPKs) du nom du découvreur des motifs catalytiques nécessaires à leurs activités. Elles présentent ainsi des similarités avec les STPKs eucaryotes car leur domaine catalytique est structurellement conservé (Hanks et al., 1988 ; Hanks et al., 1995 ; Stancik et al., 2018). Ces protéine-kinases peuvent réguler non seulement la division et la croissance cellulaire, mais aussi la persistance aux antibiotiques, la virulence, l'infection, le métabolisme, etc. (Nagarajan et al., 2022). Cette famille de protéine-kinases est très conservée parmi les bactéries, et leur nombre varie en fonction des espèces (Pereira et al., 2011). Les liaisons phosphoesters créées par ces protéine-kinases sont très stables et la réaction de déphosphorylation nécessite l'action de phosphatases (Dworkin, 2015 ; Macek et al., 2019). Les STPKs sont composées d'un domaine cytoplasmique qui comprend un domaine catalytique et un domaine juxtamembranaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine extracellulaire le plus souvent composé d'un ou plusieurs domaines PASTA (Penicillin-binding protein and Ser/Thr kinase associated domain) (Manuse et al., 2015).

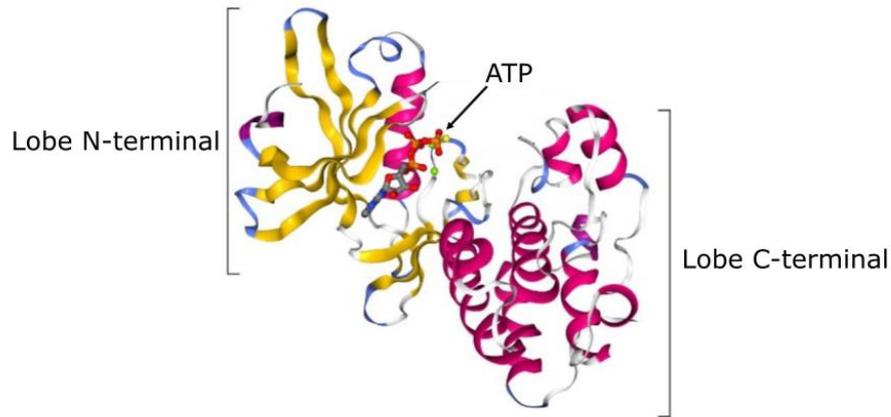


Figure 28 : Structure du domaine catalytique de PknB de *M. tuberculosis*. Le domaine catalytique (PBD : 1MRU) est composé d'un lobe N-terminal principalement constitué de feuillets bêta (en jaune) et d'un lobe C-terminal principalement constitué d'hélices alpha (en rose). L'ATP se loge entre les deux lobes. D'après (Janczarek et al., 2018 ; Stancik et al., 2018).

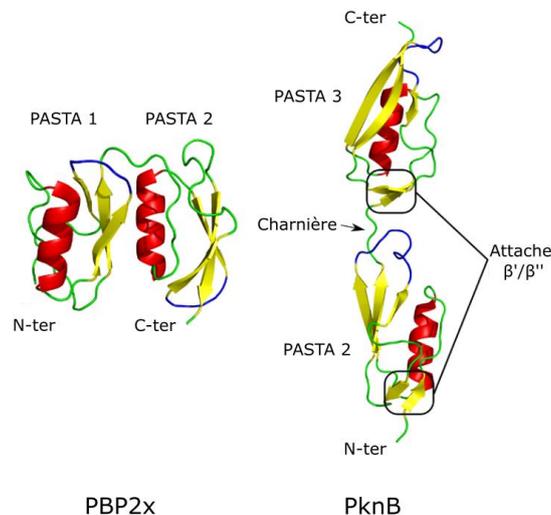


Figure 29 : Comparaison de la structure des domaines PASTA de PBP2x (*S. pneumoniae*, PDB : 1QMF) et PknB (*M. tuberculosis*, PDB : 2KUI). Les feuillets bêta sont colorés en rouge et les hélices alpha en jaune. Les domaines PASTA de PknB sont linéaires car ils sont séparés par une charnière et possèdent des feuillets bêta supplémentaires (Attache  $\beta'/\beta''$ ). D'après (Manuse et al., 2015).

Le domaine juxtamembranaire est très flexible et sa fonction n'est pas encore très bien connue. Il peut être phosphorylé et contribuer à l'activation de la protéine-kinase et/ou à l'amarrage sa(ses) cible(s) (Manuse et al., 2015). Le domaine juxtamembranaire de PknB chez *Mycobacterium tuberculosis* est phosphorylé sur deux thréonines, ce qui permet la liaison de la protéine FhaA et participe à la morphogénèse de la bactérie (Roumestand et al., 2011).

Le domaine catalytique comprend douze sous-domaines conservés composés de résidus invariables, appelés domaines de Hanks (Hanks et al., 1988 ; Manuse et al., 2015). Ces sous-domaines s'assemblent pour former un cœur catalytique comprenant deux lobes distincts, espacés par une fente où se place l'ATP (Figure 28). Le lobe N-terminal est impliqué dans la liaison à l'ATP, tandis que le lobe C-terminal est responsable de la liaison spécifique au substrat et du transfert du groupement phosphate. Dans ce lobe C-terminal se trouve une boucle d'activation, présente de manière conservée chez les STPK, qui détermine la spécificité du substrat et joue un rôle essentiel dans l'activation de la protéine kinase. (Pereira et al., 2011 ; Stancik et al., 2018).

Les domaines PASTA sont des domaines globulaires de petite taille exclusivement retrouvés chez les bactéries et il a été proposé qu'ils puissent lier des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactames. Ils sont également présents dans les PBPs, où ils sont repliés les uns contre les autres, contrairement aux STPKs où ils sont disposés linéairement (Yeats et al., 2002 ; Barthe et al., 2010 ; Gordon et al., 2000) (Figure 29). La linéarité des modules PASTA des STPKs s'explique par la présence de feuilletts bêta additionnels, non présents chez les PBPs, appelés attaches  $\beta'/\beta''$  ( $\beta'/\beta''$  braces) (Barthe et al., 2010).

Les STPKs sont très souvent membranaires mais elles peuvent également être cytosoliques comme PknG de *Mycobacterium tuberculosis* (Cowley et al., 2004). Les STPKs membranaires s'autophosphorylent, probablement en réponse à un signal (Nagarajan et al., 2022), ce qui induit un changement conformationnel qui permet de passer de la forme inactive à active et leur permet de s'autophosphoryler et de phosphoryler leurs substrats (Manuse et al., 2015). Les mécanismes par lesquels la dimérisation conduit à l'autophosphorylation sont mal

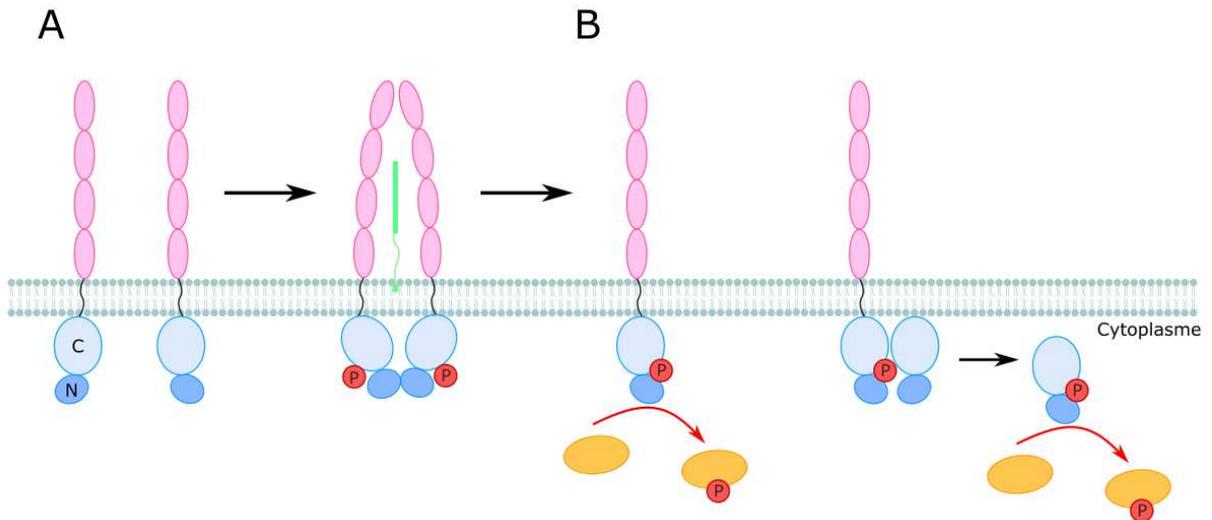


Figure 30 : Modèle d'activation de PknB chez *M. tuberculosis*. A) L'interaction du lipide II (en vert) avec les domaines PASTA de PknB (en rose) induit le rapprochement des domaines catalytiques intracellulaires des monomères. Cela résulte en la formation de dimères « dos à dos » liés par les lobes N-terminaux (en bleu foncé). B) Cela permet l'autophosphorylation de la kinase (Ⓟ rouges) qui peut ainsi activer son substrat (orange). Elle peut également activer une kinase transmembranaire ou soluble via les lobes C-terminaux (bleu clair) par la formation d'un dimère « face à face ». Adapté de (Pereira et al., 2011 ; Nagarajan et al., 2022).

connus. Cependant, la résolution de la structure de la STPK PknB de *M. tuberculosis* a permis de conduire à un modèle d'activation. Des expériences de cristallographie ont permis de résoudre la structure de PknB en dimères « dos à dos » de monomères liés par une interaction entre les lobes N-terminaux du domaine catalytique, et « face à face » de monomères liés par une interaction entre les lobes C-terminaux. Selon le modèle d'activation proposé, la dimérisation "dos à dos" induirait une activation allostérique de chaque monomère. Par la suite, les monomères activés seraient capables de former un dimère "face à face" dans lequel les thréonines de la boucle d'activation de chaque monomère seraient phosphorylées. Enfin, chaque monomère serait en mesure de phosphoryler ses cibles cellulaires jusqu'à ce que le système soit désactivé par la déphosphorylation de la boucle d'activation (Figure 30).

Le pneumocoque code pour une unique STPK membranaire, nommée StkP, dont je détaillerai le rôle et les caractéristiques dans la partie IV.2.

#### 1.4) Les tyrosines protéine-kinases typiquement bactériennes

La grande majorité des tyrosine kinases identifiées et caractérisées chez les bactéries appartiennent à la famille des protéine-tyrosine kinases typiquement bactériennes, ou BY-kinases (Grangeasse et al. 2007). Les BY-kinases régulent plusieurs processus biologiques, tels que la biosynthèse et l'export des polysaccharides de la capsule (Standish et al., 2014 ; Nourikyan et al., 2015 ; Mijakovic et al., 2016). Elles sont très conservées parmi les bactéries et la plupart d'entre elles encodent pour au moins une BY-kinase (Jadeau et al., 2012).

Les BY-kinases présentent un domaine N-terminal extracellulaire flanqué de deux hélices transmembranaires et un domaine cytoplasmique C-terminal portant l'activité kinase (Grangeasse et al., 2007). Chez les Firmicutes, ces domaines sont codés par deux gènes successifs et sont donc présents comme deux chaînes polypeptidiques séparées, qui interagissent pour former une BY-kinase active (Mijakovic et al., 2003 ; Morona et al., 2000 ; Doublet et al., 2002 ; Soulat et al., 2006) (Figure 31). Les BY-kinases se distinguent des NTPases par la présence d'un domaine supplémentaire appelé tyrosine cluster (YC), qui constitue le site d'autophosphorylation de la protéine (Grangeasse et al., 2002). Cette autophosphorylation est qualifiée de trans, car elle résulte de la phosphorylation du

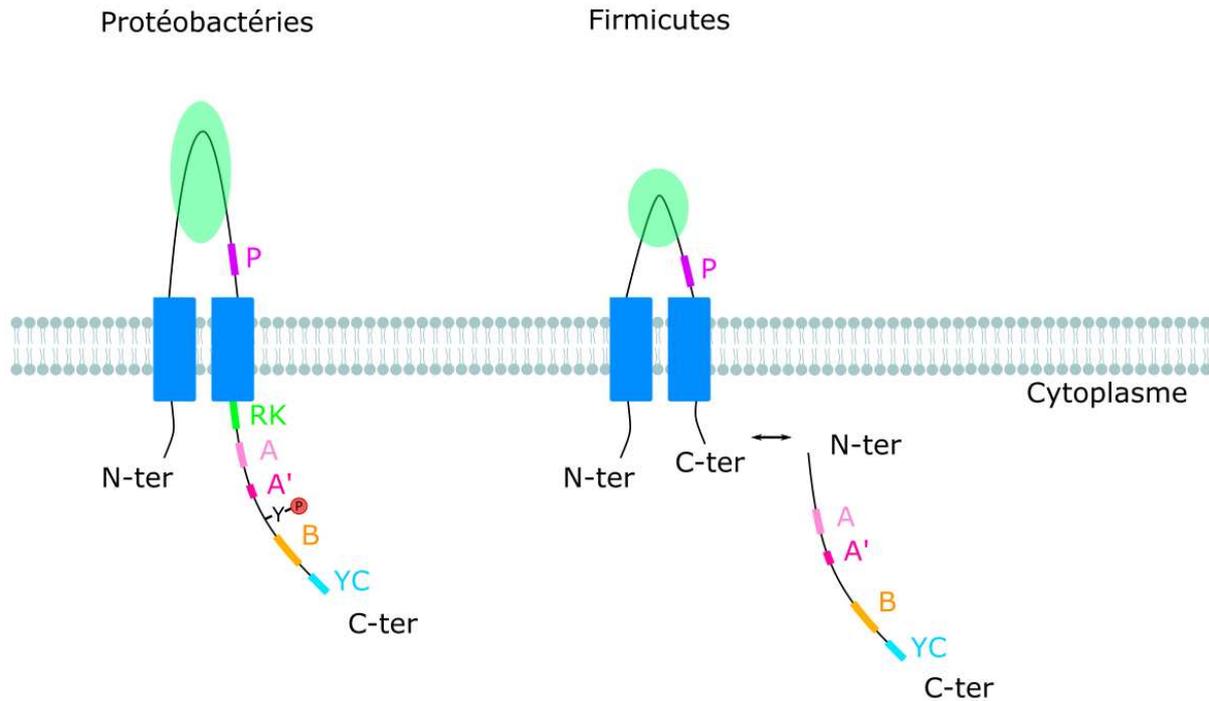


Figure 31 : Organisation des BY-kinases chez les Protéobactéries et les Firmicutes. Les BY-kinases possèdent deux domaines transmembranaires, une boucle extracellulaire composée d'un domaine en épingle à cheveux (ovales verts) et un motif riche en prolines (en violet). Chez les protéobactéries, le domaine cytoplasmique est composé d'une séquence riche en Arginines et en Lysines (appelé cluster RK, en vert), de domaines Walker A, A' et B (en rose clair, rose et orange respectivement), d'une tyrosine pouvant être phosphorylée (Y et © rouge) et d'une séquence riche en tyrosines YC (en bleu clair). Chez les Firmicutes, la boucle extracellulaire est plus courte. Le domaine cytoplasmique est séparé du domaine activateur membranaire et ne possède pas de cluster RK ni de tyrosine interne phosphorylable. Les deux sous-unités protéiques doivent interagir (double flèche) pour former une protéine-kinase active. D'après (Grangeasse et al., 2007 ; Mijakovic et al., 2016).

domaine YC d'une molécule de BY-kinase par une autre molécule. Le site actif des BY-kinases présente des motifs Walker, qui sont habituellement retrouvés dans les NTPases. Les BY-kinases possèdent un motif Walker A, A' et B, essentiels à leur activité. La substitution d'acides aminés spécifiques dans un des trois motifs (lysine ou acide aspartique) induit une forte baisse de l'activité autokinase des BY-kinases (Doublet et al., 1999 ; Soulat et al., 2007).

Le génome du pneumocoque code pour une seule BY-kinase, qui est essentielle pour la production et l'export de la capsule ainsi que pour la coordination de ce processus avec le cycle cellulaire (Henriques et al., 2011 ; Nourikyan et al., 2015 ; Mercy et al., 2019). Elle comprend le modulateur transmembranaire CpsC et le domaine kinase cytoplasmique CpsD (Morona et al., 2006 ; Henriques et al., 2011). Le génome du pneumocoque code aussi pour une phosphatase associée, CpsB. L'autophosphorylation de CpsD agit comme un système signal qui coordonne la synthèse des polysaccharides de la capsule (CPS) avec la ségrégation du chromosome (Nourikyan et al. 2015). La production de CPS a lieu exclusivement au centre de la cellule et est dépendant de l'interaction de CpsD avec CpsC. CpsD se localise au site de division et participe à l'assemblage de la capsule. En absence de CpsC, CpsD est incapable de s'autophosphoryler et de se localiser correctement (Nourikyan et al., 2015). L'absence de CpsD ou du domaine C-terminal cytoplasmique de CpsC conduit à une délocalisation de la synthèse du CPS aux pôles cellulaires et à une polymérisation associée à une accumulation des polysaccharides de faible masse moléculaire (Nourikyan et al., 2015). Une étude récente a également montré que l'autophosphorylation de CpsD module la longueur des polymères de la capsule, probablement en réponse à un signal externe (Nakamoto et al., 2021).

## 1.5) Les protéine-kinases atypiques

### 1.5.1) Les serine-kinases atypiques

Il existe deux autres types de protéine-kinases typiquement bactériennes capables de phosphoryler les résidus sérine. Elles possèdent des domaines Walker comme les BY-Kinases. Ce sont les HprK/P (Hpr kinase/phosphorylase) (Deutscher & Saier 1983) et les IDHK/P (Isocitrate déshydrogénase kinase/phosphorylase) (Nimmo et al., 1984). Ce sont des enzymes bifonctionnelles qui peuvent aussi déphosphoryler leurs substrats, effectuant ainsi cette réaction sur le même site actif que la phosphorylation (Stueland et al., 1989 ;



Fiulaine et al., 2002 ; Mijakovic et al., 2002). HprK/P stimule ou réprime l'importation de glucose en fonction de sa disponibilité dans le milieu, en phosphorylant ou déphosphorylant HPr (Brückner & Titgemeyer, 2002 ; Galinier & Deutscher, 2017). IDHK/P phosphoryle l'IDH afin d'inhiber sa fonction dans le cycle de Krebs lorsque le glucose n'est pas disponible. Ceci active la voie du glyoxylate qui permet de synthétiser des intermédiaires de ce cycle (Nimmo et al., 1984).

### 1.5.2) Les arginine protéine-kinases

Certaines protéine-kinases bactériennes sont capables de phosphoryler des résidus arginine (Andrews et al., 2008 ; Bäsell et al., 2014). Ces arginines kinases sont le plus souvent retrouvées chez les Protéobactéries mais également chez les firmicutes (Fraga et al., 2019). Elles ont été catégorisées en plusieurs familles, le cluster A, B et les protéines de la famille des McsB (Suzuki et al., 2013 ; Fraga et al., 2019). Chez *B. subtilis*, McsB est nécessaire au contrôle qualité des protéines synthétisées, plus particulièrement lors de la réponse à un stress thermique et oxydatif (Mijakovic et al., 2016). McsB phosphoryle les protéines mal repliées sur des résidus arginine, les marquant ainsi pour la dégradation (Trentini et al., 2016 ; Lilge et al., 2020). La dégradation est réalisée par le complexe protéase ClpCP. McsB est ensuite déphosphorylée par la phosphatase YwIE (Zhou et al., 2019).

### 1.5.3) Les autres protéine-kinases atypiques

Il existe aussi d'autres types de protéine-kinases atypiques, comme la Sérine/Thréonine protéine-kinase YihE de *E. coli*. Elle présente des similarités avec les STPKs mais ne possède pas les motifs signatures de Hanks caractéristiques (Manuse et al., 2015 ; Zheng et al., 2007). Elle jouerait un rôle dans la réponse aux stress environnementaux (Dorsey-Oresto et al., 2013).

Une autre famille de kinases atypiques a été découverte récemment chez *B. subtilis* (Nguyen et al., 2016). CotH, une protéine-kinase de la couche externe des spores, possède un repliement ressemblant aux protéine-kinases (PKL, protein kinase-like fold) atypique, qui présente un mode de liaison à l'ATP impliquant des résidus uniques dans la liaison aux nucléotides (Nguyen et al., 2016). Elle phosphoryle deux protéines, CotB et CotG. Une perte

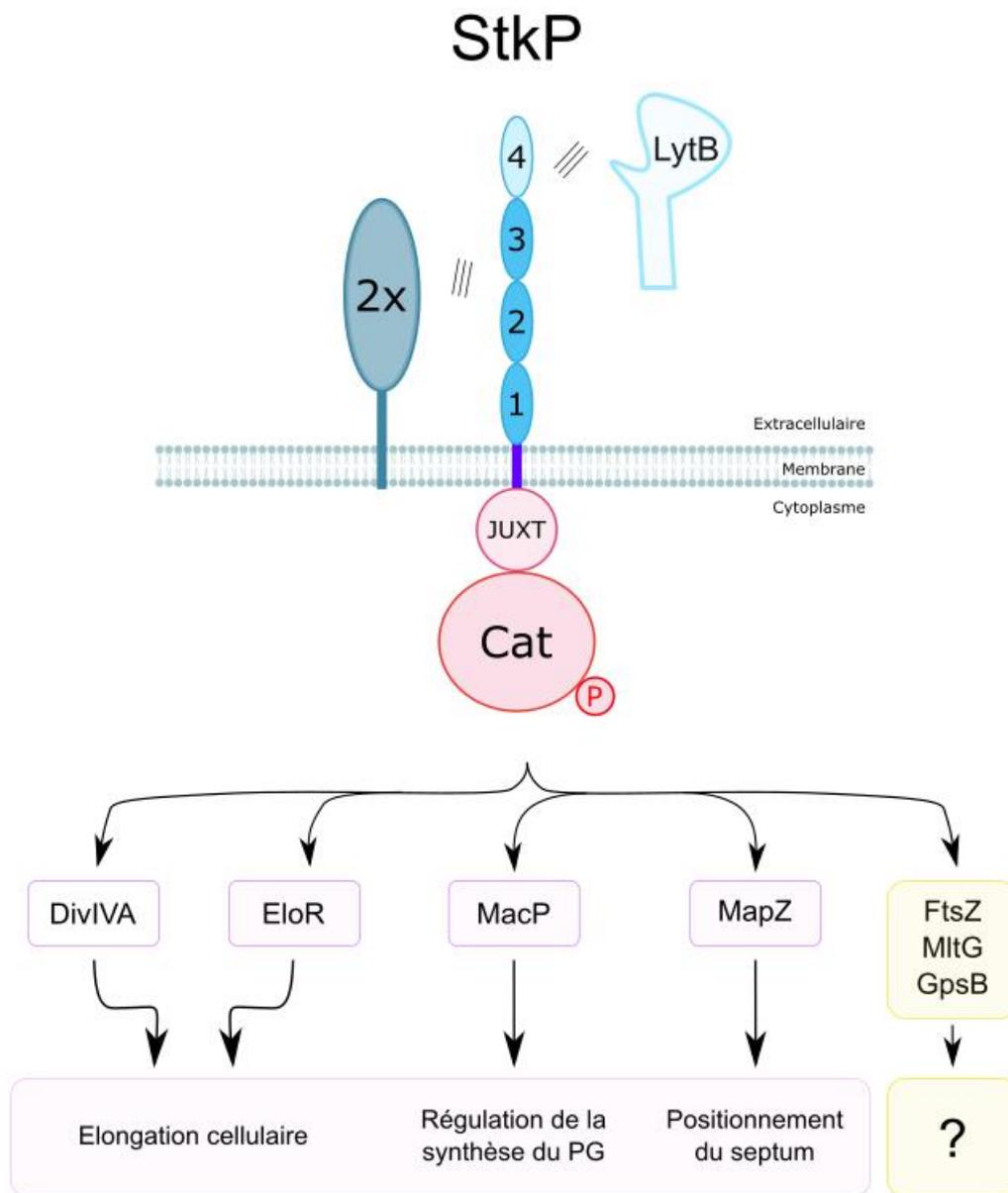


Figure 32 : StkP chez *S. pneumoniae*. StkP est une protéine bitopique dont le domaine extracellulaire est composé de 4 domaines PASTA. Le domaine extracellulaire interagit avec PBP2x (en gris). Le domaine PASTA 4 interagit avec LytB (en bleu clair). Le domaine extracellulaire est composé d'un domaine juxtamembranaire (JUXT) et d'un domaine catalytique (Cat) qui s'autophosphoryle pour phosphoryler ses substrats. Parmi de nombreux substrats identifiés, la phosphorylation de DivIVA, EloR, MacP et MapZ est nécessaire à différentes étapes de la division cellulaire. Le rôle de la phosphorylation d'autres substrats (FtsZ, MltG, GpsB) reste à caractériser. Figure modifiée à partir de (Nagarajan et al., 2021).

de leur phosphorylation affecte la structure du manteau externe des spores, et une délétion du gène codant pour CotH affecte la germination des spores (Freitas et al., 2020).

D'autres protéine-kinases peuvent également jouer un rôle dans la survie dans le macrophage en conditions d'infection, comme PkrA de *Mycobacterium tuberculosis* (Wong et al., 2018).

Enfin, il existe aussi des protéine-kinases bactériennes ubiquitaires (Ubk), largement mais exclusivement conservées dans le règne bactérien (Teplyakov et al., 2002 ; Mangat and Brown, 2008). Les protéines UbK se phosphorylent sur un résidu tyrosine et ont un motif Walker A canonique G/AX4GKT/S retrouvé notamment dans les BY-kinases. Cependant, contrairement aux BY-kinases, elles ne possèdent pas de séquence riche en tyrosine au niveau de leur extrémité C-terminale (tyrosine cluster) (Leipe et al., 2002 ; Grangeasse et al., 2007).

Chez *S. pneumoniae*, Ubk est une protéine essentielle qui s'autophosphoryle sur un unique résidu tyrosine *in vivo* (Nguyen et al., 2017 ; Pelletier et al., 2019). La phosphorylation/déphosphorylation de UbK régule son activité d'hydrolyse de l'ATP, une activité nécessaire à la croissance et à la morphologie normale du pneumocoque.

Contrairement à Ubk de *S. pneumoniae* qui s'autophosphoryle sur un unique résidu tyrosine, Ubk (anciennement nommée YdiB) de *B. subtilis* possède une activité Ser/Thr/Tyr kinase et s'autophosphoryle sur plusieurs résidus thréonine et sérine. Cette protéine est essentielle à la croissance de *B. subtilis* en conditions oxydantes (Nguyen et al., 2017 ; El-Khoury et al., 2020).

## 2) StkP, régulateur central de la division cellulaire du pneumocoque

### 2.1) Structure et fonction

StkP est le régulateur central de la division cellulaire et de la morphogénèse du pneumocoque (Beilharz et al., 2012 ; Fleurie et al., 2012 ; 2014a, b ; Grangeasse, 2016 ; Zucchini et al., 2018). C'est l'unique sérine/thréonine protéine-kinase du pneumocoque. Elle est composée de quatre domaines PASTA extracellulaires, dont les trois plus proches de la membrane sont interchangeable (Figure 32). Leur présence cumulative est cependant essentielle à l'activité de StkP. Ils modulent l'épaisseur de la paroi septale et le degré d'activation de StkP (Zucchini et al., 2018). Chez le pneumocoque, l'activation de StkP est indépendante de son interaction avec le peptidoglycane (Zucchini et al., 2018).



Au contraire, chez *M. tuberculosis*, l'interaction de la STPK PknB avec des fragments de peptidoglycane non réticulés (et contenant de l'acide meso-diaminopimelique) est essentielle pour réguler la localisation et l'activation de la protéine-kinase (Hardt et al., 2017 ; Kaur et al., 2019).

Le PASTA 4 de StkP, le motif le plus distal, est nécessaire à la localisation de StkP au site de division et contient un motif spécifique lui permettant d'interagir avec l'hydrolase LytB pour assurer la séparation correcte des cellules filles (Zucchini et al., 2018). Ainsi les modules PASTA 1, 2 et 3 sont nécessaires au positionnement et à l'activité kinase de StkP et le PASTA 4 dirige l'hydrolyse du septum par LytB.

Un mutant catalytique de StkP (StkP K42M) incapable de s'autophosphoryler et de phosphoryler ses cibles induit un allongement des cellules qui présentent de multiples septa non fonctionnels (Fleurie et al., 2012). La délétion du domaine extracellulaire de StkP conduit à un phénotype similaire. En revanche, la délétion complète du gène codant pour StkP induit la formation de cellules en chaînes et arrondies. Ceci suggère que le domaine extracellulaire de StkP contrôle l'activité kinase de StkP, que cette activité kinase est importante pour la division cellulaire du pneumocoque, mais que le rôle de StkP dans la division cellulaire n'est pas limité à sa capacité de phosphorylation de ses cibles.

## 2.2) Les substrats de StkP

StkP est connue pour phosphoryler plusieurs protéines du divisome, notamment MapZ, DivIVA, EloR et MacP (Fleurie et al., 2014 ; Fleurie et al., 2017 ; Holečková et al., 2015 ; Ulrych et al., 2016 ; Zheng et al., 2017 ; Fenton et al., 2018). Plus récemment, une analyse de phosphoprotéomique a permis d'identifier de nouveaux substrats potentiels de StkP, parmi lesquels les protéines de la division cellulaire FtsZ, MltG et GpsB (Hirschfeld et al., 2020). Toutefois, leur phosphorylation *in vivo* doit encore être confirmée.

**EloR** (Elongosome regulating protein), aussi nommée KhpB ou Jag, est une protéine conservée parmi les bactéries à Gram positif (Stamsas et al., 2017). C'est une protéine cytoplasmique composée de trois domaines : un domaine N-terminal Jag et deux domaines KH-II et R3H capables de se lier à l'ARN (Stamsås et al., 2017 ; Winther et al., 2021).



Le domaine Jag est responsable de la localisation de EloR au centre de la cellule. Ce domaine interagit avec MltG, qui pourrait être impliqué dans la localisation septale de EloR (Winther et al., 2021). EloR interagit également avec KhpA, une protéine de liaison à l'ARN, et cette interaction est indispensable à l'élongation cellulaire (Stamsås et al., 2017 ; Zheng et al., 2017). EloR, KhpA et MltG font partie d'un même complexe impliqué dans l'élongation cellulaire, localisé au centre de la cellule.

EloR est phosphorylée sur la thréonine 89 par StkP (Sun et al., 2010 ; Ulrych et al., 2016). Les domaines PASTA de StkP sont indispensables à la phosphorylation de EloR, suggérant que le niveau de phosphorylation de EloR est régulé par des signaux extérieurs *déTECTÉS* par les domaines PASTA (Stamsås et al., 2017). Tout comme un mutant  $\Delta eloR$ , un mutant exprimant une forme phosphoablative (déphosphorylée de façon permanente) présente des cellules plus courtes. En revanche, une mutation permettant l'expression d'une forme phosphomimétique (constitutivement phosphorylée) n'est pas tolérée, sauf si elle est accompagnée de mutations suppressives dans les gènes codant pour les protéines MreC et RodZ, impliquées dans l'élongation cellulaire (Stamsås et al., 2017). Ces résultats montrent que EloR est nécessaire à l'élongation cellulaire de *S. pneumoniae*. La phosphorylation de EloR par StkP n'est pas nécessaire à la localisation de EloR au centre de la cellule, mais est indispensable à son activité. En effet, la forme phosphorylée de EloR stimule l'élongation cellulaire, alors que la forme déphosphorylée est inactive ou moins active (Stamsås et al., 2017).

**MacP** est un autre substrat de StkP, phosphorylé sur la thréonine 32 (Fenton et al., 2018). Elle est composée d'un domaine cytoplasmique N-terminal et d'un domaine transmembranaire C-terminal. MacP se localise au centre de la cellule où elle interagit spécifiquement avec PBP2a pour promouvoir son activité. La délétion de *macP* entraîne la formation de cellules plus petites et qui lysent facilement, un phénotype similaire à celui d'un mutant  $\Delta pbp2a$ . Un mutant phosphoablatif de MacP empêche l'activité de PBP2a, sans pour autant affecter leur interaction. Ainsi, la phosphorylation de MacP régule l'activité de PBP2a et donc la division cellulaire.



**DivIVA**, une autre protéine du divisome, est également un substrat de StkP. La délétion du gène codant pour DivIVA conduit à la formation de petites cellules en chaînes, ce qui traduit un rôle dans l'élongation cellulaire (Fleurie et al., 2014b). DivIVA est phosphorylée par StkP sur la thréonine 201. Un mutant DivIVA phosphoablatif présente des cellules allongées avec des renflements polaires (Fleurie et al., 2012). Le niveau de phosphorylation de DivIVA est contrôlé par GpsB, qui stimule l'activité kinase de StkP pour phosphoryler ses cibles (Fleurie et al., 2014b).

DivIVA est une protéine conservée parmi les bactéries à Gram positif. DivIVA est phosphorylée chez de nombreuses bactéries et est impliquée dans la régulation de la division cellulaire, la croissance polaire ou la ségrégation des chromosomes (Hammond et al., 2019).

Chez *Streptomyces coelicolor*, DivIVA est phosphorylée par la STPK AfsK et sa phosphorylation régule la localisation du polarisome (Hempel et al., 2012).

Chez *B. subtilis*, DivIVA interagit avec la STPK PrkC (Dworkin et al., 2015 ; Pompeo et al., 2015 ; Pompeo et al., 2018) et des études *in vitro* ont montré qu'elle était phosphorylée sur un résidu sérine (Ravikumar et al., 2014). Cependant, PrkC ne semble pas être responsable de la phosphorylation de DivIVA (Pompeo et al., 2015). Alternativement, l'arginine kinase McsB, pourrait phosphoryler DivIVA sur un résidu arginine et jouer un rôle dans la sporulation (Van Baarle et al., 2013). D'autre part, une tyrosine kinase, PtkA, est également capable de phosphoryler DivIVA en se localisant aux pôles par interaction avec MinD (Shi et al., 2014). Le rôle de la phosphorylation de DivIVA chez *B. subtilis* reste à être élucidé.

Chez *M. tuberculosis*, DivIVA, également appelée Wag1, est phosphorylée par au moins une STPK, PknA, sur un résidu thréonine (Kang et al., 2005 ; Lee et al., 2014). La phosphorylation de Wag1 pourrait intervenir dans la régulation de la synthèse du peptidoglycane (Jani et al., 2010).

**MapZ** est également phosphorylé sur deux résidus thréonine, T67 et T78 par StkP. La phosphorylation de MapZ n'influence pas son organisation structurale, ni son interaction avec FtsZ ou avec les lipides de la membrane (Fleurie et al., 2014a, Hosek et al., 2020). En revanche, les mutants phosphoablatifs et phosphomimétiques de MapZ présentent des défauts morphologiques et de viabilité, avec des structures aberrantes de FtsZ,

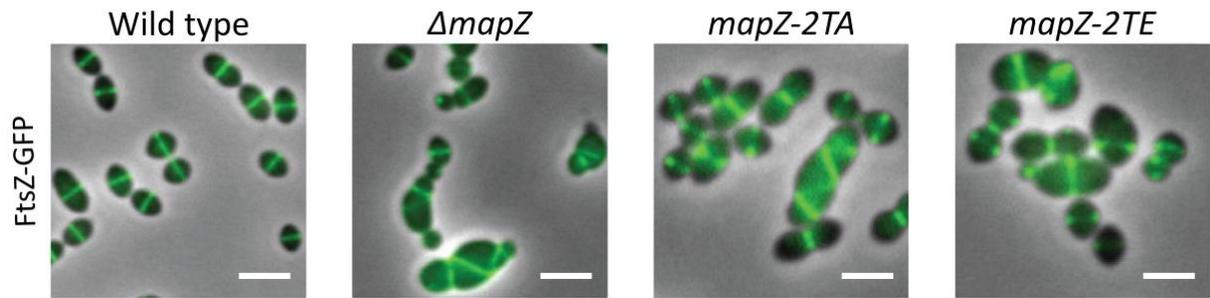


Figure 33 : Morphologie des différents mutants *mapZ* et localisation de FtsZ-GFP. Les images de contraste de phase sont superposées à la fluorescence. Barre d'échelle : 2  $\mu\text{m}$ . (Fleurie et al., 2014).

des diamètres et orientations de l'anneau Z altérés et un nombre réduit d'anneaux Z par cellule (Fleurie et al., 2014a) (Figure 33). Ainsi l'équilibre entre les formes phosphorylées et non phosphorylées de MapZ est nécessaire à la formation de l'anneau Z et à sa constriction. MapZ agit donc comme un régulateur bifonctionnel, assurant d'une part le positionnement de l'anneau Z de manière indépendante de la phosphorylation, et contrôlant d'autre part la dynamique et la stabilité de l'anneau Z de manière dépendante de la phosphorylation.

Ces observations indiquent que d'autres partenaires de MapZ, dont les fonctions seraient affectées par la phosphorylation de MapZ, restent à être identifiés. De plus, la région cytoplasmique de MapZ est intrinsèquement désordonnée et présente deux motifs de reconnaissance moléculaires MoRFs (Molecular recognition features). Ces MoRFs ont une propension à former des hélices amphipathiques et pourraient se structurer au contact d'un partenaire (Radivojac et al., 2007 ; Vacic et al., 2007 ; Tompa et al., 2008). Enfin, la présence d'un large patch d'acides aminés conservés (résidus 18-67) parmi les Streptococcaceae suggère l'existence d'interactions protéine-protéine avec le domaine N-terminal qui pourraient être conservées (Ashkenazy et al., 2016).

Dans ce contexte, j'ai identifié au cours de ma thèse, un nouveau partenaire de MapZ. Il s'agit de EzrA, une protéine du divisome dont l'interaction avec MapZ est modulée par son niveau de phosphorylation. Les détails sur l'interaction entre ces deux protéines seront exposés dans la section des résultats de ce manuscrit.

Les quatre substrats que j'ai décrits sont des protéines impliquées dans la division cellulaire, dont le rôle de la phosphorylation a été plus ou moins caractérisé. Outre son rôle dans la division cellulaire, StkP joue également un rôle crucial dans la coordination de la division cellulaire avec la compétence. Une observation intéressante est que la phosphorylation de plusieurs substrats de StkP est réduite après l'induction de la compétence, notamment celle de DivIVA, ce qui suggère un lien étroit entre la compétence et la division cellulaire (Bergé et al., 2017). De fait, StkP phosphoryle le régulateur de réponse ComE sur la Thréonine 128, ce qui influence la régulation globale de la transcription lors d'un stress acide. Cela favorise la résistance aux antibiotiques qui ciblent la paroi cellulaire (Piñas et al., 2018). La phosphorylation de ComE par StkP déclenche également l'autolyse médiée par LytA (Piñas et al., 2018), jouant ainsi un rôle crucial dans la virulence et la survie du pathogène.



Au-delà de son rôle de phosphorylation, StkP interagit avec d'autres protéines. Notamment GpsB, dont l'interaction avec le domaine kinase de StkP est essentielle à la localisation de StkP au centre de la cellule et indispensable pour phosphoryler ses substrats (Fleurie et al., 2014b ; Zheng et al., 2017). StkP module également l'activité de PBP2x (détaillé au chapitre III.2.2) et de LytB (détaillé au chapitre III.2.3).

StkP participe aussi à la régulation de l'expression du pilus et module ainsi l'adhérence du pathogène aux cellules eucaryotes (Herbert et al., 2015).

L'unique sérine/thréonine protéine-kinase du pneumocoque semble donc orchestrer de nombreux réseaux dont on ne connaît pas encore l'ensemble des fonctions.

### 2.3) La phosphatase PhpP

Il existe deux superfamilles de phosphatases de STPKs : les phosphoprotéines phosphatases (PPP) et les phosphatases dépendantes des métaux (PPM). Le pneumocoque code pour une unique PPP connue, PhpP, dépendante du  $Mn^{2+}$  (Novakova et al., 2005). C'est une protéine cytoplasmique dont le domaine catalytique contient 11 motifs signatures conservés. La mutation de deux acides aminés ultra conservés (D192 et D231) indispensables à l'interaction avec le  $Mn^{2+}$  conduit à la perte de la fonction enzymatique de la phosphatase (Bork et al., 1996 ; Novakova et al., 2005). Cette enzyme est localisée de manière diffuse dans le cytoplasme mais elle peut être enrichie au septum de division, uniquement lorsque StkP est exprimée (Beilharz et al., 2012).

Une surexpression du gène *phpP* conduit à la déphosphorylation des substrats de StkP. Les mutants de surexpression ont un phénotype similaire à celui d'un mutant  $\Delta$ *stkP*, avec des cellules allongées qui présentent de multiples septa de division non constrits (Ulrych et al., 2016). A l'inverse, la délétion du gène *phpP* conduit à l'hyperphosphorylation de StkP et de ses substrats. Les mutants  $\Delta$ *phpP* présentent une morphologie similaire à celle observée lors d'une surexpression de StkP, caractérisée par de petites cellules avec une constriction prématurée de l'anneau Z (Ulrych et al., 2016). PhpP régule donc l'activité de StkP et est capable de déphosphoryler directement ses substrats (Ulrych et al., 2016).

Des études récentes de phosphoprotéomique comparant des souches sauvage,  $\Delta$ *stkP* et  $\Delta$ *phpP* ont permis d'identifier de nouveaux substrats de StkP qui pourraient également être déphosphorylés par PhpP (Hirschfeld et al., 2020 ; Ulrych et al., 2021).



PhpP interagit également avec le régulateur de réponse orphelin RitR. En compétition avec StkP pour son interaction, il régule l'absorption du fer chez le pneumocoque (Ulijasz et al., 2009). D'autre part, la délétion du gène *phpP* chez le pneumocoque conduit à une augmentation de l'abondance des protéines impliquées dans l'import du phosphate, ce qui suggère que le rôle de PhpP puisse aller au-delà de l'unique déphosphorylation des substrats de StkP (Stülke et al., 2020).



## Objectif des travaux

Comme cela a été présenté dans la partie bibliographique, la division cellulaire est un processus complexe, régulé par un ensemble complexe de protéines, nécessitant la coordination d'un ensemble d'interaction et d'activités protéiques au sein de la machinerie protéique de division. Les protéine-kinases jouent un rôle important dans la régulation des mécanismes mis en jeu.

Mon travail de thèse a donc consisté à préciser le rôle de la phosphorylation dans la régulation de la division cellulaire de la bactérie *Streptococcus pneumoniae* tout en essayant de caractériser la fonction des protéines impliquées dans le fonctionnement du divisome.

A partir de là je me suis concentrée sur la phosphorylation de la protéine MapZ et sur la caractérisation d'une protéine nouvellement identifiée au laboratoire et nécessaire à la morphogénèse du pneumocoque.

La protéine MapZ assure le positionnement correct de l'anneau Z. Cependant, le rôle exact de la phosphorylation de MapZ reste mystérieux à ce jour. Dans le cadre de mes recherches au laboratoire, j'ai découvert un nouveau partenaire de MapZ, la protéine du divisome EzrA. Cette dernière est une protéine précoce du divisome assurant la stabilité de FtsZ au site actif de division. J'ai montré que EzrA interagit avec MapZ préférentiellement lorsqu'elle est non phosphorylée. Mes résultats indiquent que la dynamique de EzrA est altérée dans un mutant phosphomimétique, ce qui suggère que la phosphorylation constitutive de MapZ empêche EzrA d'identifier correctement le site de division. En intégrant l'ensemble de ces résultats, j'ai pu proposer un modèle dans lequel la phosphorylation de MapZ constitue un niveau de régulation supplémentaire, permettant de contrôler la dynamique et la stabilité de l'anneau Z en interagissant avec EzrA.

Au cours de ma thèse, j'ai également identifié une nouvelle protéine impliquée dans la morphogénèse du pneumocoque : CopD (Coordinator of PBP1a and PBP2b dynamics). J'ai montré que CopD interagit spécifiquement avec la PBP de classe A PBP1a et la PBP de classe B PBP2b. L'absence de CopD perturbe la dynamique spatio-temporelle de ces PBPs. L'ensemble des résultats obtenus nous ont permis de proposer un modèle dans lequel CopD



contrôle la morphogénèse du pneumocoque en régulant la localisation spatiale et temporelle de PBP1a et PBP2b.

Ces deux études menées au cours de ma thèse ont contribué à une meilleure compréhension du mécanisme de division cellulaire chez le pneumocoque, de l'assemblage du divisome à la synthèse et au remodelage du peptidoglycane.



# Matériel et méthodes



## Souches et conditions de culture

Les souches de *S. pneumoniae* ont été cultivées en milieu C+Y (Tableau 1), à 37°C, jusqu'à ce que la culture atteigne une densité optique à 550nm ( $DO_{550nm}$ ): 0,1-0,2. Pour les transformations, les souches ont été ensemencées en masse dans des géloses Todd-Hewitt Yeast (THY) (Todd, Hewitt, 1932 ; Becton Dickinson) supplémentées de 3% (vol/vol) de sang de cheval défibriné et incubées pendant 120 minutes à 37°C. La sélection des clones transformants lors de la construction de mutants a ensuite été réalisée par ajout d'une surcouche de THY agar contenant l'antibiotique approprié (streptomycine 200 µg/mL, kanamycine 250 µg/mL) puis incubé la nuit à 37°C. Pour les observations en microscopie, des cellules prélevées en phase exponentielle de croissance ( $DO_{550nm}$  : 0,1) ont été utilisées. Les courbes de croissance ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre JASCO détectant automatiquement la  $DO_{550nm}$  toutes les 10 minutes.

Les souches de *E. coli* suivantes ont été utilisées : (i) XL1-Blue et DH5α pour les clonages, (ii) BL21 (DE3) et BL21 star (DE3) pour la surexpression des protéines, (iii) BTH101 pour le système BACTH et (iv) TB28 pour le système POLAR. Du milieu LB (bouillon lysogène) et du LB agar (Bertani, 1951 ; MP Biomedicals) supplémenté de l'antibiotique approprié ont été utilisés pour la culture à 37°C. Pour le POLAR, du milieu M9 (Manuse et al., 2016) supplémenté de l'antibiotique approprié ainsi que 0,2% de casaminoacides et 0,2% d'arabinose a été utilisé. La croissance cellulaire a été mesurée par lecture de la DO à 600nm. Les souches utilisées dans cette étude sont répertoriées dans le Tableau 2.

Composant	Concentration finale
L-cystéine	58,3 µM
Sodium acétate	22,2 mM
Hydrolysate de caséine	0,45% (masse/volume)
L-tryptophane	26,8 µM
Hydrogénophosphate de potassium	33,9 µM
Eléments à ajouter extemporanément	
Chlorure de Manganèse anhydride	0,36 µM
L-glutamine	136 µM
D-glucose	10,1 mM

Sodium pyruvate	2,5 mM
D-saccharose	0,86 mM
Uridine	73,7 $\mu$ M
Adénosine	67,4 $\mu$ M
BSA (Serum Albumine Bovine)	10,5 $\mu$ M
Extrait de levure	0,23% (masse/volume)
L-Asparagine	0,34 mM
Choline	43,7 mM
Chlorure de calcium anhydre	0,1025 mM
Sulfate de fer heptahydrate	1,64 $\mu$ M
Sulfate de cuivre pentahydrate	1,83 $\mu$ M
Sulfate de zinc heptahydrate	1,58 $\mu$ M
Chlorure de manganèse tétrahydrate	0,92 $\mu$ M
Chlorure de magnésium hexahydrate	2,24 mM
Biotine (Vitamine B7)	0,2 $\mu$ g
Acide nicotinique (Vitamine B3)	0,2 mg
Pyridoxine hydrochloride (Vitamine B6)	0,2 mg
Calcium panthothénate (Vitamine B5)	0,6 mg
Thiamine hydrochloride (Vitamine B1)	0,2 mg
Riboflavine (Vitamine B2)	0,1 mg

Tableau 1 : Composition du milieu C+Y. Ce milieu est autoclavé 30 minutes à 120°C. Les éléments ajoutés extemporanément sont filtrés avec un filtre 0,22 $\mu$ m. Ce milieu doit être ajusté à pH 7,4.

Souche	Génotype et description	Référence	Amorces (Tableau 3)
<i>S. pneumoniae</i>			
R800	Dérivée de <i>S. pneumoniae</i> R6	Don de J.-P. Claverys, Toulouse, France	
Wild type	<i>R800 rpsL1</i>	Don de J.-P. Claverys, Toulouse, France	
$\Delta mapZ$	<i>R800 rpsL1, \Delta mapZ; Str<sup>R</sup></i>	Fleurie et al., 2014	1-4
<i>gfp-mapZ</i>	<i>R800 rpsL1, gfp-mapZ; Str<sup>R</sup></i>	Fleurie et al., 2014	1-8
$\Delta mapZ, ezrA-gfp$	<i>R800 rpsL1, \Delta mapZ, ezrA-gfp; Str<sup>R</sup></i>	Fleurie et al., 2014	18, 20-24
<i>P<sub>ComX</sub>-gfp-mapZ-<math>\Delta extra\Delta H1</math></i>	<i>R800 rpsL1, P<sub>ComX</sub>-gfp-mapZ-<math>\Delta extra\Delta(M1-G41)</math>; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	9-14
<i>P<sub>ComX</sub>-gfp-mapZ-<math>\Delta extra\Delta H1-2TA</math></i>	<i>R800 rpsL1, P<sub>ComX</sub>-gfp-mapZ-<math>\Delta extra\Delta(M1-G41)-T67-78A</math>; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	9-14
<i>P<sub>ComX</sub>-gfp-mapZ-<math>\Delta extra\Delta H1-2TE</math></i>	<i>R800 rpsL1, P<sub>ComX</sub>-gfp-mapZ-<math>\Delta extra\Delta(M1-G41)-T67-78E</math>; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	9-14
<i>P<sub>ComX</sub>-gfp-mapZ-<math>\Delta extra\Delta H1-2TA, hlpA-mkate2</math></i>	<i>R800 rpsL1, P<sub>ComX</sub>-gfp-mapZ-<math>\Delta extra\Delta(M1-G41)-T67-78A, hlpA::hlpA-mkate2-cm</math>; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	9-16
<i>P<sub>ComX</sub>-gfp-mapZ-<math>\Delta extra\Delta H1-2TE, hlpA-mkate2</math></i>	<i>R800 rpsL1, P<sub>ComX</sub>-gfp-mapZ-<math>\Delta extra\Delta(M1-G41)-T67-78E, hlpA::hlpA-mkate2-cm</math>; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	9-16
<i>P<sub>ComX</sub>-gfp-mapZ-<math>\Delta extra\Delta H1-2TA, mkate2-mapZ</math></i>	<i>R800 rpsL1, P<sub>ComX</sub>-gfp-mapZ-<math>\Delta extra\Delta(M1-G41)-T67-78A, mkate2-mapZ</math>; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	9-14
<i>P<sub>ComX</sub>-gfp</i>	<i>R800 rpsL1, P<sub>ComX</sub>-gfp; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	9-11, 17-19

<i>gfp-mapZ-2TA</i>	<i>R800 rpsL1, gfp-mapZ-T67-78A; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	1-8
<i>gfp-mapZ-2TE</i>	<i>R800 rpsL1, gfp-mapZ-T67-78E; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	1-8
<i>mapZ-2TA, ezrA-gfp</i>	<i>R800 rpsL1, mapZ-T67-78A, ezrA-gfp; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	1, 2, 18, 20-24
<i>mapZ-2TE, ezrA-gfp</i>	<i>R800 rpsL1, mapZ-T67-78E, ezrA-gfp; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	1, 2, 18, 20-24
<i>ezrA-gfp</i>	<i>R800 rpsL1, ezrA-gfp; Str<sup>R</sup></i>	Fleurie et al., 2014b	18, 20-24
<i>mkate2-mapZ</i>	<i>R800 rpsL1, mkate2-mapZ; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	1-2, 25-28
<i>mecfp-mapZ</i>	<i>R800 rpsL1, mecfp-mapZ; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	1-2, 28-31
<i>ezrA-yfp</i>	<i>R800 rpsL1, ezrA-yfp; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	18, 20-24
<i>mcherry-stkP</i>	<i>R800 rpsL1, mcherry-stkP; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	32-37
<i>gfp-stkP</i>	<i>R800 rpsL1, gfp-stkP; Str<sup>R</sup></i>	Fleurie et al., 2012	
<i>ezrA-gfp, mkate2-mapZ</i>	<i>R800 rpsL1, ezrA-gfp, mkate2-mapZ; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	20, 21
<i>ezrA-gfp, mcherry-stkP</i>	<i>R800 rpsL1, ezrA-gfp, mcherry-stkP; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	32, 33
<i>mkate2-mapZ, gfp-stkP</i>	<i>R800 rpsL1, mkate2-mapZ, mcherry-stkP; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	32, 33
<i>mecfp-mapZ, mcherry-stkP, ezrA-yfp</i>	<i>R800 rpsL1, mecfp-mapZ, ezrA-yfp, mcherry-stkP; Str<sup>R</sup></i>	Cette étude	20, 21, 32, 33
<i>E. coli</i>			
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-F'[proAB + lacIqlacZΔM15 Tn10]; Tc<sup>R</sup></i>	Bullock et al., 1987	
BTH101	<i>F, cya-99, araD139, galE15, galk16, rpsL1, hsdR2, mcrA1, mcrB1; Str<sup>R</sup></i>	Euromedex	
BL21 (DE3)	<i>F, ompT gal dcm lon hsdSB (rB-mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gène 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Studier et al., 1986	
BL21 star (DE3)	<i>F ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS)</i>	Invitrogen	
TB28	<i>F-λ<sup>-</sup> rph-1 DE(lacIZYA)::FRT</i>	Bernhardt and de Boer, 2003	

Plasmides			
<i>pT7.7-mapZ<sub>Cyto</sub>-2TA-TEV-6his</i>	PT7.7 dérivé, codant pour MapZ T67-78A, de Met1 à Gly159	Hosek et al. 2020	
<i>pT7.7-mapZ<sub>Cyto</sub>-2TE-TEV-6his</i>	PT7.7 dérivé, codant pour MapZ T67-78E, de Met1 à Gly159	Hosek et al. 2020	
<i>pKT25</i>	P <sub>Lac</sub> -T25, kan pACYC ori	Karimova et al., 2004	
<i>pUT18C</i>	P <sub>Lac</sub> -T18, bla	Karimova et al., 2004	
<i>pKT25-zip</i>	P <sub>Lac</sub> -T25-leucine zipper région (levure GCN4), kan pACYC ori	Karimova et al., 2004	
<i>pUT18C-zip</i>	Plac-T18-leucine zipper region from yeast GCN4. bla	Karimova et al., 2004	
<i>pKNT25-mapZ<sub>Cyto</sub>-2TA</i>	mapZ <sub>Cyto</sub> -T67-78A-P <sub>Lac</sub> -T25 kan pACYC ori	Cette étude	38-41
<i>pKNT25-mapZ<sub>Cyto</sub>-2TE</i>	mapZ <sub>Cyto</sub> -T67-78E-P <sub>Lac</sub> -T25 kan pACYC ori	Cette étude	38-41
<i>pUT18-ezrA</i>	ezrA-Plac-T18 bla pUC ori	Cette étude	38, 39, 42, 43
<i>pHCL149-mapZ<sub>Cyto</sub>-2TA</i>	pHCL149 dérivé, codant pour MapZ T67-78A, de Met1 à Gly159	Cette étude, POLAR	44-47
<i>pHCL149-mapZ<sub>Cyto</sub>-2TE</i>	pHCL149 dérivé, codant pour MapZ T67-78E, de Met1 à Gly159	Cette étude, POLAR	44, 45, 48, 49
<i>pHCL151-erzA</i>	pHCL151 dérivé, codant pour EzrA	Cette étude, POLAR	50-53
<i>pCA10</i>	pGEX-4T1 dérivé, codant pour EzrA, de Arg28-Lys310	Don de C. Morlot	
<i>pCA12</i>	pGEX-4T1 dérivé, codant pour EzrA, de Arg220-Arg421	Don de C. Morlot	
<i>pCA13</i>	pGEX-4T1 dérivé, codant pour EzrA de Arg304 à Phe575	Don de C. Morlot	
<i>pCA15</i>	pGEX-4T1 dérivé, codant pour EzrA de Arg220 à Phe575	Don de C. Morlot	

Tableau 2 : Liste des souches et plasmides utilisés.

Numéro	Nom	Séquence 5'-3'
1	mapZ-amont (+)	GTCTAGCCTCTTTAAACGTGG
2	mapZ-aval (-)	GCATCAAGTCATAGCTTTCTGC
3	mapZ-délétion (-)	GAATTTTGTAAACGACTGCGAGTATCCCTTTCTATTTACCTC
4	mapZ-délétion (+)	GAAAGGGATACTCGCAGTCGTTACAAAATTCTTTC
5	Amont-gfp-mapZ (-)	CAATTCTTCACCTTTAGAAATCATGAGTATCCCTTTCTATTTTAA CCTC
6	gfp (+)	ATGATTTCTAAAGGTGAAGAATT
7	gfp-Linker (-)	TCCGGATCCCTCGAGTTTATACAATTCATCCATACCATGTG
8	Linker 1 (+)	CTCGAGGGATCCGGA
9	cpsN (+308) (+)	CATCGGAACCTATACTCTTTTAG
10	cpsO (+800) (-)	ATAACAAATCCAGTAGCTTTGG
11	P <sub>ComX</sub> (0) (+)	TGAACCTCCAATAATAAATATAAAT
12	cpsN/0 (+1106) (+)	TTTCTAATATGTAACCTTCCCAAT
13	P <sub>ComX</sub> / mapZ (+)	ATTGGGAAGAGTTACATATTAGAAATTAGTAGTCCAAGTCAT CCGCATGACCAGCG
14	P <sub>ComX</sub> / Gfp (-)	ATTTATATTTATTATTGGAGGTTCAATGATTTCTAAAGGTGAA GAATTG
15	hlpA (+)	CGAAGTTAGCTCAAGAAG
16	hlpA (-)	CAGGTTGATATTATCG
17	cpsN-O-gfp(+1106) (+)	GGTATGGATGAATTGTATAAATAATTTCTAATATGTAACCTTT CCCAAT
18	gfp (-)	TTATTTATACAATTCATCCATACC
19	gfp (+)	ATGATTTCTAAAGGTGAAGAATTG
20	ezrA-amont (+)	CAGCCATGGGAACAGGATTTG
21	ezrA-aval (-)	TTTATGATATTTAGCTGTACGAGAGTC
22	ezrA-gfp (-)	CTGCAGGAACCTCGATGTCTAGTTTAAAACGAATCGTTTCACG TGTTTTTC
23	Linker 2 (+)	AAACTAGACATCGAGTTCCTGCAGATGATTTCTAAAGGTGAA GAATTG
24	gfp-aval-ezrA (+)	GGTATGGATGAATTGTATAAATAATAAAAGAAAAAGATTTT ATTGTGTGAGG

25	rfp-amont-mapZ (-)	CTGAACCGGTAAGATGTTTCATGAGTATCCCTTCTATTTTAC CTC
26	rfp (+)	ATGAAACATCTTACCGG
27	rfp-Linker2 (+)	TCCGGATCCCTCGAGCAATTTACTAGGCAAATCAC
28	Linker2-mapZ (+)	CTCGAGGGATCCGGAATGAGTAAAAAAGACGAAATCG
29	mecfp-amont-mapZ (-)	CTTCACCTTTAGAAACCATGAGTATCCCTTCTATTTTACCTC
30	mecfp (+)	ATGGTTTCTAAAGGTGAAGAATTG
31	mecfp-Linker2 (-)	TCCGGATCCCTCGAGTTTATAACAATTCATCCATACC
32	stkP-amont (+)	GTTGATACCCAGATCGATACAG
33	stkP-aval (-)	AGGCAAAACCAAATAAGGTCTG
34	mcherry-linker (-)	TCCGGATCCCTCGAGCTTGTACAGCTCGTC
35	mcherry-stkP (+)	ATGAACGAGGAGGATGCAGAATGATTGTGAGCAAGGGCGA
36	Linker2-mcherry-StkP (+)	CTCGAGGGATCCGGAATGATCCAAATCGGCAAGATTTTTG
37	phpP-aval (-)	TCATTCTGCATCCTCCTCGTTC
38	pUT18/pKNT25 (+)	CGGGTACCGAGCTCGAATTCA
39	pUT18/pKNT25 (-)	CTCTAGAGTCGACCTGCAG
40	pKNT25-mapZ <sub>Cyto</sub> (+)	CAGGTCTGACTCTAGAGATGAGTAAAAAAGAC
41	pKNT25-mapZ <sub>Cyto</sub> (-)	TCGAGCTCGGTACCCGTTAGCCTTTTTTACTT
42	pUT18-ezrA (+)	CAGGTCTGACTCTAGAGATGTCTAATGGACAAC
43	pUT18-ezrA (-)	GGTACCCGAAAACGAATCG
44	pHCL149 (-)	GTCGCAGACGTTTTGCAGC
45	pHCL149-mapZ <sub>Cyto</sub> (+)	TGGCGGTGGATCCATGAGTAAAAAAGACG
46	pHCL149-mapZ <sub>Cyto</sub> -2TA(+)	AGTTTGCGGCTCGTCAATACAAAAAAGAGGAGTTCGTTGAA GCTCAGAGTCT
47	pHCL149-mapZ <sub>Cyto</sub> -2TA (-)	CCAGACTCTGAGCTTCAACGAACTCCTCTTTTTTG
48	pHCL149-mapZ <sub>Cyto</sub> -2TE (+)	GTATTGACGTTCCGCAAACCTTATCCGCCTC
49	pHCL149-mapZ <sub>Cyto</sub> -2TE (-)	TGAATTCGAGCTCGGTACCCGTTATTCTGTATCTACAACAAC ATAGCGATTTG
50	pHCL151 (-)	GGATCCACCGCCAGACCAG
51	pHCL151 (+)	CTCGAGTAAGCTTATCGATCTCACG
52	pHCL151-ezrA (+)	TGGTCTGGGCGGTGGATCCATGTCTAATGGACAATAAT
53	pHCL151-ezrA (-)	GATCGATAAGCTTACTCGAGAAAACGAATCGTTTCACGTG

Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour les constructions des souches ou plasmides. Les amorces sens et antisens sont notées (+) et (-) respectivement.

### **Mutagenèse par remplacement allélique**

Les souches isogéniques de *S. pneumoniae* ont été construites par transformation dans la souche sauvage R800. Pour la construction des mutants, les transformations ont été réalisées comme précédemment décrit (Martin et al., 2000), en utilisant des cellules pré-compétentes traitées à 37°C avec du peptide stimulant la compétence (CSP 1). Les mutants *S. pneumoniae* (délétion de gènes, fusions aux protéines fluorescentes) ont été construits en deux étapes, basé sur une cassette kan-rpsL bicistronique appelée Janus (Sung et al., 2001). Le procédé Janus permet le remplacement d'un gène par une cassette puis la délétion ou la substitution de la cassette par une forme allélique mutée et/ou fusionnée à une étiquette fluorescente au locus du gène chromosomique. La cassette Janus et les régions situées en amont et en aval du gène d'intérêt sont amplifiées par PCR. Les fragments obtenus sont fusionnés par PCR et les zones d'homologie permettant l'insertion de la cassette au sein du génome par recombinaison homologue. Le procédé Janus permet une expression physiologique des protéines mutées et/ou fusionnées à une étiquette. La cassette Janus est soit utilisée pour remplacer un gène d'intérêt, soit insérée à son extrémité 5' ou 3' si le gène est essentiel. Cela confère une résistance à la kanamycine et une sensibilité à la streptomycine dans la souche sauvage R800 rpsL1 (Kan<sup>R</sup>-Str<sup>S</sup>). Ensuite, n'importe quel fragment d'ADN flanqué à chaque extrémité des séquences homologues aux régions en amont et en aval du gène d'intérêt peut être utilisé pour transformer des souches Kan<sup>R</sup>-Str<sup>S</sup> afin d'obtenir des mutants Kan<sup>S</sup>-Str<sup>R</sup>, non polaires, non marqués. Une fois obtenus, ces transformants ont été repiqués en colonies uniques et l'intégration correcte au locus chromosomique a été vérifiée par PCR et séquençage. La liste des amorces utilisées pour la construction des souches est dans le Tableau 3.

### **Transformation de *E. coli***

Pour obtenir des cellules de *E. coli* compétentes, une préculture des souches est réalisée dans du LB avec les antibiotiques appropriés et incubée à 37°C avec agitation sur la nuit. La préculture est diluée 100 fois dans du LB + antibiotiques et incubée à 37°C sous agitation

jusqu'à  $DO_{600nm}$  : 0,4. La culture est laissée 10 min à 4°C puis centrifugée 10 min à 5 000 x g à 4°C. Le culot est repris par 1/5<sup>ème</sup> du volume initial de  $CaCl_2$  0,1M et placé dans la glace pendant 1 h. Les cellules sont de nouveau centrifugées 10 min à 5 000 x g à 4°C puis resuspendues avec 1/50<sup>ème</sup> du volume initial de  $CaCl_2$  0,1M avec du glycérol 15% (vol/vol) et stockées à -80°C.

Pour la transformation, 100µL de cellules compétentes sont mélangées à 10 ng d'ADN pendant 30 minutes à 4°C. Un choc thermique est réalisé pendant 50 secondes à 42°C puis les cellules sont placées dans la glace pendant 1 minute. 900 µL de LB sont rajoutés et la culture est incubée pendant 1h30 à 37°C sous agitation pour permettre l'expression phénotypique. Les cellules sont étalées sur une gélose de LB-agar additionnée d'antibiotique dans un boîte de Pétri et laissées la nuit à 37°C. Les clones sont ensuite vérifiés par PCR et séquençage.

### **Construction des plasmides**

Des fragments d'ADN codant pour différentes versions de EzrA et de MapZ ont été obtenus par PCR en utilisant de l'ADN chromosomique de *S. pneumoniae* R800. La liste des plasmides construits ainsi que les amorces utilisés est disponible (Tableaux 2 et 3). Les plasmides de double hybride bactérien ont été construits avec le vecteur fourni pour le système BACTH (Euromedex). Les plasmides d'expression ont été construits en utilisant le vecteur pGex (plasmides offerts par C. Morlot) pour les fragments de EzrA et le vecteur PetPhos a été utilisé pour les versions de MapZ (Fleurie et al., 2014). Les vecteurs pEtPhos d'expression des différentes versions de MapZ cytoplasmique (du résidu 1 à 159) sont suivis d'un linker de 3 acides aminés (LQG), d'un site de clivage à la TEV (ENLYFQRGG) et d'une étiquette hexahistidine (Fleurie et al., 2014). Les vecteurs pGex d'expression des différentes versions de EzrA sont suivis d'un linker (LVPRGS), d'un site de clivage à la TEV (ENLYFQRGG) et d'une étiquette GST. Pour le POLAR, les gènes *mapZ<sub>Cyto</sub>-2TA* et *mapZ<sub>Cyto</sub>-2TE* ont été clonés dans le vecteur pHCL149 et *ezrA* dans le vecteur pHCL151 (vecteurs offerts par T. Bernhardt). Les plasmides ont été construits en utilisant la méthode Gibson assembly (Gibson et al., 2012). Les fragments chevauchants du vecteur et de l'insert ont été amplifiés par PCR. Les réactions PCR ont été traitées à la DpnI (20U / 50µL de réaction PCR) pendant 2 heures à 37°C et purifiées sur colonne. Le vecteur et l'insert ont été mélangés à un ratio 1:3 (0,1pmol vecteur

et 0,3pmol insert) avec une réaction de Gibson (Tris pH 7,5 0,5M, MgCl<sub>2</sub> 0,05M, dNTP 4mM, D,L-Dithiothreitol (DTT) 0,05M, polyéthylène glycol (PEG 8000) 0,25g/mL, nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) 5mM, T5 exonuclease 0,004 U/μL, polymérase Phusion® 0,025 U/μL, Taq ligase 4U/μL) et chauffé à 50°C pendant 1h30. La réaction finale a été transformée dans une souche *E. coli* DH5α ou TB28. Les séquences nucléotidiques de tous les fragments d'ADN ont été vérifiées par séquençage.

### **Techniques de microscopie et analyse d'images**

Les souches contenant une copie ectopique des gènes d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur P<sub>ComX</sub> ont été induites 15 minutes avec 12,5nM de ComS avant l'observation. Les cellules ont ensuite été concentrées par centrifugation pendant 3 minutes à 5000 rpm, puis observées sur une couche d'agarose (milieu C+Y + agarose 1%) sous lame-lamelle. Les lames ont été observées avec un microscope à épifluorescence inversé Nikon Ti-Eclipse couplé à une caméra CCD (Charge-Coupled Device ; Hamamatsu Flash4 V2) et doté du système PFS (Nikon's Perfect Focus System). Les images ont été capturées en utilisant le logiciel Nis-Elements AR (Nikon). L'acquisition des images de fluorescence a été faite avec un temps d'exposition minimal (1s pour les captures et 300ms pour les captures en *time-lapse*) pour minimiser les phénomènes de photoblanchiment et les effets de la phototoxicité. Les images de fluorescence ont été recolorées de façon à faciliter la compréhension des résultats et à optimiser la distinction des couleurs. Les images recolorées ont ensuite été superposées aux images en contraste de phase. Les paramètres d'acquisition de toutes les protéines fluorescentes utilisées sont répertoriés dans le Tableau 4. L'analyse des images de microscopie a été réalisée grâce au logiciel ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) et à l'extension MicrobeJ (Ducret et al., 2016).

Protéine fluorescente	$\lambda_{ex}$	$\lambda_{em}$	$\lambda_{filtre}$	Protéines marquées	Référence
mGFP	485	508	488	MapZ, EzrA	Cormack et al., 1996
mKate2	588	633	588	MapZ, Hlpa	Shcherbo et al., 2009
mCherry	587	610		StkP	Shaner et al., 2004
mScarlet	569	594		EzrA	Bindels et al., 2016
mECFP	433	475	433	MapZ	Ai et al., 2006
MYFP	515	528	510	EzrA	Zacharias et al., 2002

Tableau 4 : Caractéristiques des différentes protéines fluorescentes utilisées, avec  $\lambda_{ex}$ ,  $\lambda_{em}$  et  $\lambda_{filtre}$  les longueurs d'ondes d'émission, d'excitation et la longueur d'onde du filtre d'excitation utilisés.

### Double hybride bactérien

Des expériences de double hybride bactérien en système BACTH (Bacterial Adenylate Cyclase Two Hybrid System) ont été réalisées selon les instructions du fabricant (Euromedex). Les gènes natifs ou mutés de *mapZ* et de *ezrA* ont été clonés dans des plasmides et fusionnés aux parties tronquées de l'adénylate cyclase (T25 / T18), en C-terminal de celles-ci (respectivement PKNT25 et pUT18). Des souches de *E. coli* BTH101 ont été co-transformées avec un plasmide appât contenant une version cytoplasmique de MapZ cytoplasmique phosphoablative ou phosphomimétique (MapZ<sub>Cyto</sub>2TA, MapZ<sub>Cyto</sub>2TE) et avec un plasmide proie contenant le gène *ezrA*. Les co-transformants ont été déposés sur boîte de Pétri contenant du LB agar supplémenté d'antibiotiques (ampicilline 100 µg/mL, kanamycine 25 µg/mL), à 37°C sur la nuit. Un clone issu de chaque dépôt a ensuite été repiqué dans du LB + antibiotiques et déposé sur boîte de pétri contenant du LB agar supplémenté de X-gal (40 µg/mL), isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 0,5 mM, antibiotiques. Les boîtes ont été incubées 15 heures à 30°C puis laissées à température ambiante. Des photographies ont été prises à 24, 48, 60 et 72 heures de croissance. L'expérience a été réalisée en triplicat. Les plasmides utilisés pour cette expérience sont listés dans le Tableau 2.

### Système POLAR

Un clone issu de la co-transformation a été cultivé sur la nuit à 37°C sous agitation dans du LB supplémenté de l'antibiotique approprié (ampicilline 50µg/µL, tétracycline 7,5µg/mL, chloramphénicol 15µg/mL). Un volume de suspension bactérienne (volume calculé pour obtenir une DO<sub>600nm</sub> finale de 0,2) a été centrifugé puis le culot resuspendu dans 1mL de M9 supplémenté de casaminoacides 0,2% et additionné d'arabinose 0,2% et d'IPTG 200µM. Le mélange a été laissé 2 heures à 37°C sous agitation, puis observé au microscope. L'expérience a été réalisée en triplicat. Pour l'analyse de microscopie, les foci GFP et mScarlet co-localisés ont été comptés et rapportés au nombre de cellules totales. Le comptage a été fait manuellement sur 1000 cellules pour chaque expérience.

### **Co-immunoprécipitation**

Une culture des souches de *S. pneumoniae* a été réalisée dans 500mL de THY (additionné de 2 µM de ComS lorsque nécessaire), à 37°C jusqu'à une DO<sub>550nm</sub> : 0,2. Après centrifugation, les culots cellulaires ont été lavés en PBS 1X puis incubés 15 minutes à 30°C dans un tampon protoplaste (PBS 1X, MgCl<sub>2</sub> 2mM, sucrose 1M, inhibiteur de protéases Roche 1X, 6 µg/mL DNase I et RNase A). Après centrifugation, les culots ont été incubés 15 minutes à 30°C en tampon protoplaste additionné de mutanolysine (8U/mL), lysosyme (8mg/mL) et Dithiobis Succinimidyl Propionate (DSP) 1mM. Après centrifugation, les culots ont été repris dans un tampon hypotonique (0,1M Tris-HCl, 100mM NaCl, 1 mM acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), 1 % (vol/vol) digitonine, inhibiteur de protéases Roche 1X, 6 µg/mL DNase I et RNase A, 8 mg/mL lysosyme, mutanolysine 8U/mL) et incubés 30 minutes à 37°C. Après centrifugation, le surnageant a été incubé avec une suspension de résine GFP-Trap® selon les recommandations du fabricant (Chromotek). Le surnageant a été incubé 2 heures en présence de la résine, puis éliminé après centrifugation. Ensuite, la résine a subi trois étapes de lavage, par incubations de deux minutes avec un tampon de lavage (10mM Tris HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 0,5 mM EDTA, inhibiteur de protéases Roche 1X) et centrifugations. Ensuite, les protéines ont été éluées avec du tampon Laemmli (Laemmli, 1970) sans β mercaptoéthanol à 95°C pendant 10 minutes.

### **Analyse par LC-MS/MS**

Les échantillons issus de la co-immunoprécipitation ont été analysés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE à 10% de polyacrylamide. Les gels ont ensuite été révélés au nitrate d'argent, en suivant les instructions du fabricant (Thermo Scientific). La bande d'intérêt révélée en nitrate d'argent a été analysée par LC-MS/MS. Après décoloration, réduction et alkylation des protéines dans la bande de gel, elles ont été digérées à la trypsine sur la nuit à 37°C. Les peptides ainsi obtenus ont été dilués à 0,1% d'acide méthanoïque et analysés sur le spectromètre de masse hybride quadripôle-Orbitrap Q Exactive HF (Thermo Scientific). Le spectromètre de masse a été utilisé en mode positif, couplé à un système de chromatographie liquide à faible débit nanoRSLC (Thermo Fisher), suivant un gradient de 40 minutes en mode TOP20 DDA HCD (les 20 ions les plus intenses sont automatiquement sélectionnés pour analyse par MS-MS) sur colonne de 50 cm de diamètre. Le fichier de données a été ensuite traité avec Proteome Discoverer 2.4 en utilisant le moteur de recherche SEQUEST HT (Tabb, 2015) et la banque de données UniProt de *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-255 R6. Les peptides identifiés ont été validés par une recherche de faux positif à 1%.

### **Préparation des extraits bruts de *S. pneumoniae* et Western Blot**

Pour les expériences de Western Blot, des extraits bruts de *S. pneumoniae* ont été préparés. Les culots cellulaires ont été resuspendus en tampon Tris-EDTA (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8) et les protéines ont été extraites par sonication en réalisant 3 cycles de 30 secondes à 30% d'amplification sur un appareil Branson Ultrasonics. Ensuite, 25µg de protéines ont été chargées sur un gel SDS-PAGE à 12,5% d'acrylamide. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane PVDF (PolyVinidylidene Fluorure), préalablement activée dans du méthanol 100 %, pendant 30 min à 100 mA dans du tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM pH 8, glycine 0,192M, méthanol 20% (vol/vol) et sodium dodecyl sulfate (SDS) 0,04% (vol/vol)). La membrane est ensuite lavée avec du tampon Tris Buffer Saline Tween (TBST) (Tris-HCl 100mM pH 8, NaCl 150mM, Tween® 20 0,05%), puis incubée pendant 1 h avec du tampon de blocage (5% BSA-TBST). Après un lavage de 10 min avec du tampon adéquat, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire pendant 1 heure sous agitation douce, puis lavée trois fois 10 minutes avant d'être incubée avec l'anticorps secondaire pendant 1 heure (Tableau 5). Enfin, la membrane est lavée trois fois 10 minutes. Les membranes ont été

révélées avec un kit « SuperSignal West Pico Chemluminescent Substrate» de Thermo Scientific® et les images ont été acquises par la caméra Fusion de Vilber-Lourmat®. Lorsque nécessaire, l'intensité des bandes a été mesurée avec l'outil Mesure du logiciel ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Anticorps primaire	Conditions d'incubation	Référence
GFP	1 : 10 000, 1% BSA-TBST	AMS Biotechnology®
MapZ	1 : 5 000, 1% BSA-TBST	Eurogenetec®
EzrA	1 : 5 000, 1% BSA-TBST	Don de C. Morlot
StkP	1 : 1 000, 1% BSA-TBST	Fleurie et al., 2012
Enolase	1 : 250 000, 5% BSA-TBST	Fleurie et al., 2012

Tableau 5 : Conditions d'immunorévélation des protéines avec un anticorps spécifique. L'anticorps secondaire utilisé est le Goat anti-rabbit (GAR), dirigé contre le lapin, couplé à la HRP (HorseRadish Peroxidase) de Biorad®. Il a été dilué 5000 fois dans du TBST-1% BSA.

### Purification de protéines

Les plasmides de surexpression ont été transformés dans des souches *E. coli* BL21 (DE3) et *E. coli* BL21 star (DE3) pour les mutants de EzrA et MapZ respectivement. Les souches ont été cultivées en milieu LB à 37°C avec de l'ampicilline 100 µg/mL jusqu'à DO<sub>600nm</sub> : 0,5 puis induites avec 0,5mM d'IPTG pendant 3 heures à 37°C (MapZ) ou sur la nuit à 25°C (EzrA). Les cellules ont ensuite été collectées et congelées à -20°C.

Pour la purification des mutants de MapZ, les culots cellulaires ont repris dans du tampon de lyse (HEPES 25mM pH 7,4, NaCl 300mM, glycerol 10%) supplémenté de 20mM d'imidazole, de 1mg/mL de lysozyme, de 6µg/mL de DNase I et RNase A et de l'inhibiteur de protéases Roche 1X. Après sonication (1 minute à 30% d'amplification et 1 minute à 40% d'amplification sur un sonicateur Branson Ultrasonics) et centrifugation (30 minutes à 14 000 x g, 4°C), le surnageant a été chargé sur une colonne Ni-NTA (Qiagen). Les protéines ont été éluées en tampon HEPES 25mM pH 7,4, NaCl 300mM supplémenté de 200mM d'imidazole. Les fractions contenant les protéines exprimées ont été rassemblées et dialysées sur la nuit à 4°C dans un tampon HEPES 10mM pH 7,4, NaCl 150mM supplémenté de 1mM d'EDTA.

Les mutants de EzrA ont été purifiés en utilisant une colonne GST (GE Healthcare). Les cellules ont été lysées en tampon de lyse : HEPES 50mM pH 7,4, NaCl 200mM, lysozyme 1mg/mL, 6µg/mL DNase I et RNase A, inhibiteur de protéases Roche 1X. Les protéines ont été éluées en tampon d'éluion : HEPES 50mM pH 7,4, NaCl 200mM, glutathion 10mM. L'étiquette GST a été clivée en incubant la protéine purifiée avec la protéase His6-tagged tobacco etch virus (TEV) à un ratio 40 :1 (masse/masse) en présence de 0,5mM d'EDTA et 1mM de DTT. Le mélange a été dialysé sur la nuit à 4°C dans un tampon HEPES 10mM pH 7,4, NaCl 150mM, 0,5mM EDTA, 1µM DTT. Les protéines clivées ont été chargées sur une colonne Ni-NTA/GST en ratio 1:5 (vol/vol). La solution qui s'est écoulé du filtre, contenant les protéines clivées, a été récupérée.

La pureté des protéines a été vérifiée par gel SDS-PAGE 12,5% d'acrylamide. La concentration en protéines a été estimée par dosage Coomassie (Sigma) et les protéines ont été conservées à -80°C.

### **Résonance plasmonique de surface**

Des expériences d'interaction protéine-protéine en temps réel ont été réalisées sur un système BIAcoreT100® (GE Healthcare). Les fragments de EzrA ont été couplés de manière covalente à la surface d'une puce de capteur CM5 (Cytiva), à une concentration de 10µg/mL. Des concentrations croissantes de MapZCyto-2TA (0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10µM) ont été injectées à la surface de la puce à une vitesse de 30mL/minute dans du tampon HEPES (pH 7,4) supplémenté de 150mM de NaCl et 0,005% de surfactant P20. Les liaisons non spécifiques à la surface de la puce ont été soustraites par injection des analytes sur une puce vierge. Les sensorgrammes ont été analysés sur le logiciel BIAevaluation (GE Healthcare). Les constantes d'affinité (KD) ont été calculées à partir du signal de résonance d'équilibre (Req) en fonction de la concentration de l'analyte. Les valeurs Req ont été estimées par extrapolation d'un temps infini en utilisant les plots de signaux de résonance en fonction du temps. Le KD apparent a été calculé selon  $Req = R_{max}C/(KD+C)$ , où Rmax est le maximum de capacité de liaison de la surface et C'est la concentration en analyte. Les mesures ont été faites en triplicat.

# Résultats

## Partie I – Rôle de la phosphorylation de la protéine MapZ dans la régulation de la division cellulaire chez *Streptococcus pneumoniae*

La protéine MapZ assure le positionnement de l'anneau Z en interagissant directement avec FtsZ. Des études précédentes au laboratoire ont montré que le domaine cytoplasmique de MapZ est phosphorylé par la sérine-thréonine kinase StkP, mais que l'interaction avec FtsZ ne dépend pas du niveau de phosphorylation de MapZ. Cependant, l'équilibre entre les formes phosphorylées et déphosphorylées de MapZ est essentiel au maintien d'une morphologie correcte et au positionnement du divisome. Nous avons donc entrepris d'étudier le rôle de la phosphorylation de MapZ, jusqu'alors inconnu. Nous avons émis l'hypothèse que MapZ interagirait avec d'autres protéines, potentiellement des protéines du divisome, dont l'interaction serait modulée par le niveau de phosphorylation de MapZ.

Pour comprendre le rôle de la phosphorylation de MapZ dans l'interaction avec d'autres partenaires, des formes de MapZ mimant un état de phosphorylation permanent (phospho-mimétique) ou de déphosphorylation permanent (phospho-ablative) ont été construites. Pour s'affranchir des domaines interagissant avec la paroi cellulaire et le divisome, ces formes de MapZ ont été dépourvues du domaine extracellulaire et du domaine d'interaction avec FtsZ. Afin de déterminer leur localisation, ces formes de MapZ ont été fusionnées à la GFP. Pour éviter les défauts morphologiques induits par la phosphorylation ou la déphosphorylation constitutive de MapZ, ces formes MapZ ont été exprimées sous le contrôle d'un promoteur inductible afin de conserver une copie du gène *mapZ* sauvage au locus chromosomique. De manière intéressante, seule la forme phospho-ablative présentait une localisation septale comparable à celle du divisome, suggérant que celle-ci interagirait spécifiquement avec un ou plusieurs membres du divisome.

Une co-immunoprécipitation de la forme phospho-ablative de MapZ couplée à une analyse en spectrométrie de masse LC/MS-MS a permis d'identifier la protéine membranaire EzrA. Cette protéine est décrite comme intervenant dans la stabilisation de l'anneau Z. Cette interaction a été testée en double hybride bactérien et en système POLAR, confirmant que



MapZ et EzrA interagissent préférentiellement lorsque MapZ est sous forme non phosphorylée. L'expression de formes tronquées de EzrA et du domaine cytoplasmique de MapZ sous forme phospho-ablatif a ensuite permis de confirmer l'interaction des protéines par résonance plasmonique de surface.

J'ai ensuite comparé la dynamique de relocalisation de EzrA-GFP dans des mutants phospho-ablatifs et phospho-mimétiques de MapZ au locus chromosomique grâce à des expériences de microscopie en TIRF. Ces expériences ont montré que la dynamique de EzrA est altérée dans un mutant phospho-mimétique, ce qui suggère que la phosphorylation constitutive de MapZ empêche EzrA d'identifier correctement le site de division.

Enfin, la fusion de MapZ, EzrA et StkP à des sondes fluorescentes a permis de déterminer leur dynamique au cours du cycle cellulaire et de proposer un modèle de l'interaction. Ainsi, la phosphorylation de MapZ constituerait un niveau de régulation supplémentaire, permettant de contrôler la dynamique et la stabilité de l'anneau Z en interagissant avec EzrA.

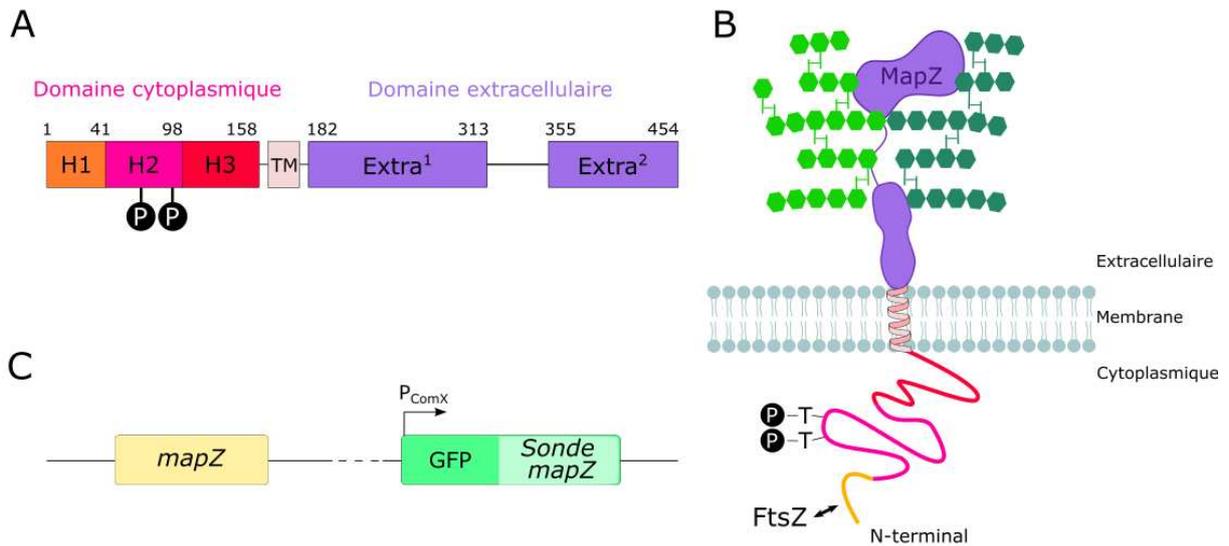


Figure 34 : A) Organisation structurale de MapZ. Le domaine cytoplasmique a été séparé en trois sous-parties pour l'étude sur la base de la description présentée dans (Fleurie et al., 2014). H1 interagit avec FtsZ, H2 comprend les sites de phosphorylation (notés Ⓟ) et H3 correspond au reste de la partie cytoplasmique. Le sous-domaine Extra<sup>2</sup> interagit avec le peptidoglycane. B) Représentation schématique de MapZ. C) Représentation des mutants expriment le gène *mapZ* au locus et une version mutée (sonde) du gène sous le contrôle du promoteur ectopique  $P_{ComX}$ .

## Construction des sondes MapZ

Des travaux antérieurs ont montré que l'expression d'une forme mutée de MapZ, simulant un état phosphorylé permanent (phosphomimétique) ou non phosphorylé permanent (phosphoablatif), provoque des défauts morphologiques et de positionnement importants du divisome (Fleurie et al., 2014) (Figure 34). Par conséquent, étudier le rôle de la phosphorylation de MapZ en utilisant des souches mutées dans le gène *mapZ* au locus pourrait entraîner un biais en raison de l'impact de ces mutations sur le fonctionnement du divisome. Pour pallier ce problème, nous avons adopté une approche différente, en utilisant des souches sauvages où nous avons exprimé ectopiquement les formes mutées au niveau des sites de phosphorylation de *mapZ* fusionné à une protéine fluorescente GFP sous le contrôle d'un promoteur inductible. La présence de la copie sauvage du gène *mapZ* au locus chromosomique assure une division correcte du pneumocoque alors que la sonde joue le rôle de rapporteur. (Figure 34C). Ainsi, les formes mutées ectopiques de MapZ nous permettent d'étudier plus précisément le rôle de la phosphorylation de MapZ sans perturber le fonctionnement global du divisome.

Nous avons construit cinq sondes différentes pour notre étude :

- (i) GFP-MapZ : Cette sonde exprime une version non tronquée et non mutée de MapZ (Figure 34A). Elle a été utilisée comme référence pour comparer la localisation des autres sondes avec celle de MapZ de type sauvage.
- (ii) GFP-MapZ- $\Delta$ Cyto : Dans cette sonde, le domaine cytoplasmique de MapZ est délété (Figure 34B). Son utilisation nous a permis de montrer que la localisation de MapZ reste inchangée lorsque le domaine extracellulaire est toujours présent.
- (iii) GFP-MapZ- $\Delta$ Extra : Cette sonde est dépourvue du domaine extracellulaire de MapZ (Figure 34C). Elle nous a permis de déterminer la localisation de MapZ en l'absence du domaine d'interaction avec la paroi cellulaire.
- (iv) GFP-MapZ- $\Delta$ Extra- $\Delta$ H1 : Dans cette sonde, le domaine extracellulaire ainsi que le domaine d'interaction avec FtsZ (domaine H1) ont été supprimés (Figure 34D). Cette sonde nous a permis de déterminer la localisation de MapZ en l'absence des domaines responsables de sa localisation septale.

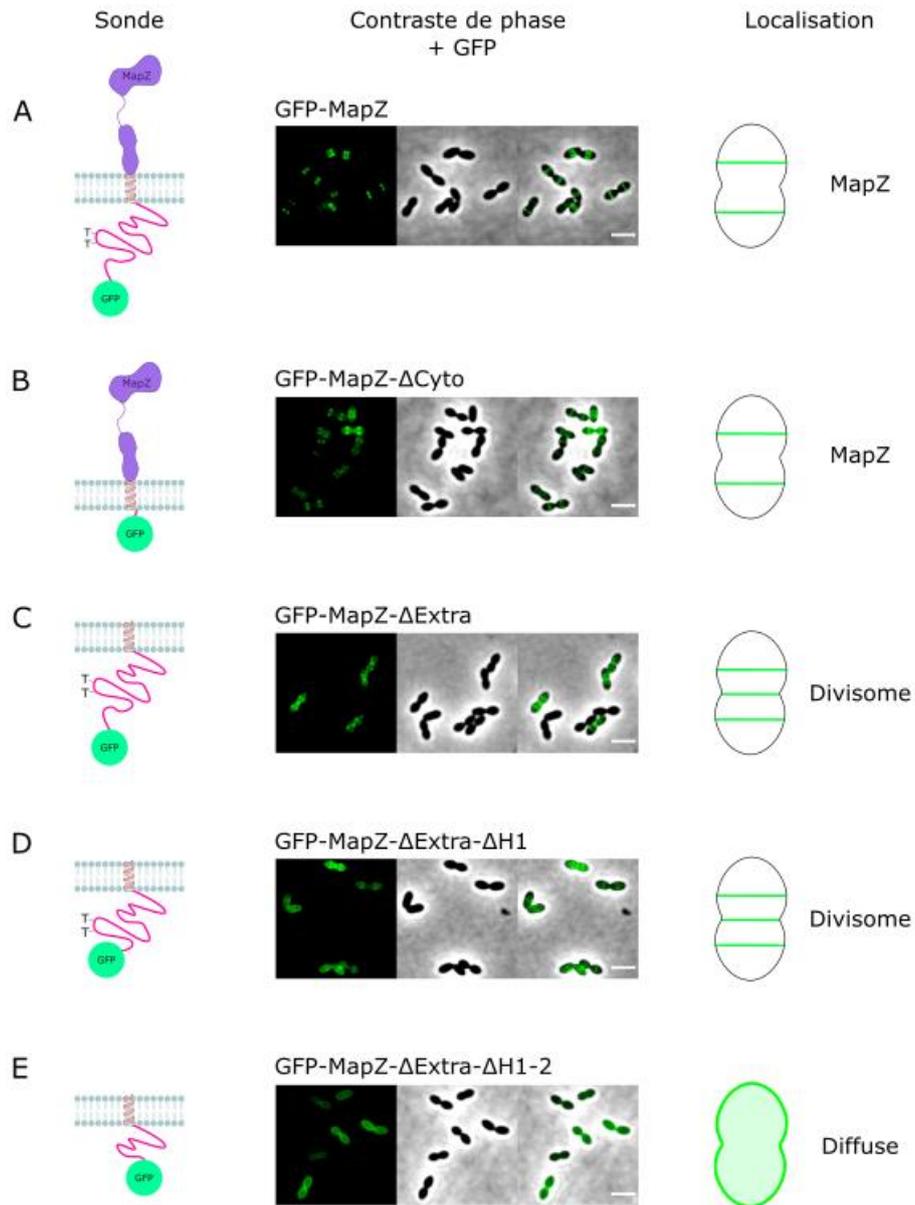


Figure 35 : Localisation subcellulaire des différentes sondes MapZ. Chaque sonde est représentée schématiquement à gauche des images de microscopie. La localisation des sondes est représentée schématiquement à droite des images de microscopie. MapZ : localisation similaire à MapZ endogène. Divisome : localisation ressemblant à celle d'une protéine du divisome. Diffuse : Localisation diffuse dans la membrane. L'expression des sondes est induite 15 minutes avec 12,5 nM de ComS. Barre d'échelle : 2µm.

(v) GFP-MapZ- $\Delta$ Extra- $\Delta$ H1-2 : Cette sonde est déléetée du domaine extracellulaire ainsi que de la partie cytoplasmique contenant les sites de phosphorylation de MapZ (Figure 24D). Son utilisation nous a permis d'explorer l'impact de la phosphorylation de MapZ sur sa localisation subcellulaire.

### **Le domaine cytoplasmique de MapZ interagit avec le divisome**

L'observation de la sonde fluorescente de MapZ déléetée de son domaine cytoplasmique (GFP-MapZ- $\Delta$ Cyto) au microscope montre une localisation et une dynamique comparables à la version endogène (GFP-MapZ), caractérisée par la formation d'un anneau au centre de la cellule qui se sépare en deux dès le début de la constriction et qui migre à mesure que la cellule s'allonge (Figure 35AB). Par conséquent, la déléetion du domaine cytoplasmique de MapZ n'affecte pas sa localisation, ce phénomène peut s'expliquer par la présence du domaine extracellulaire de MapZ. Celui-ci établit une interaction avec la paroi cellulaire, ce qui permet à la sonde MapZ de suivre les équateurs cellulaires.

Au contraire, la déléetion du domaine extracellulaire (GFP-MapZ- $\Delta$ Extra) entraîne une modification du profil de localisation. Déléetée de son domaine d'interaction avec le peptidoglycane, MapZ n'est plus capable de reconnaître le motif signature de la frontière entre l'ancien et le nouveau pôle cellulaire. A la place, cette sonde suit un profil de localisation caractéristique d'une protéine du divisome. Cette sonde se caractérise en effet par la formation d'un anneau au site actif de division qui migre aux équateurs au fil de la division cellulaire, ce qui donne lieu à l'apparition de trois anneaux fluorescents dans les phases tardives de la division cellulaire (Figure 35C). Cette observation traduit la capacité du domaine cytoplasmique de MapZ à interagir avec une protéine du divisome.

Le domaine cytoplasmique de MapZ est une région largement intrinsèquement désordonnée (Hosek et al., 2020). Des prédictions de structures secondaires du domaine cytoplasmique avaient initialement conduit à la définition de trois régions notées H1, H2 et H3 (Figure 34A et C) (Fleurie et al., 2014). Dans cette étude, nous avons choisi de conserver cette nomenclature. Il a été démontré que la zone d'interaction avec FtsZ se limitait à la région H1 (Fleurie et al., 2014). Afin de déterminer si MapZ est capable d'interagir avec une autre

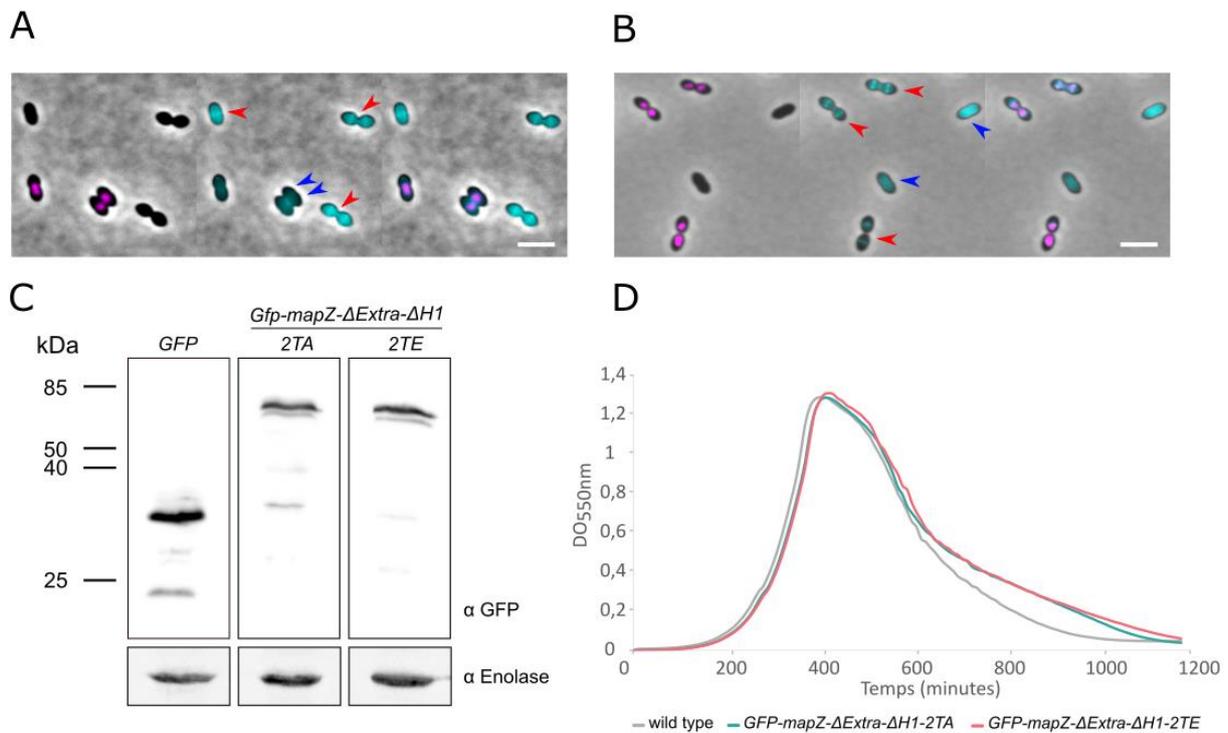


Figure 36 : Comparaison de la localisation subcellulaire des sondes phosphomimétique et phosphoablative marquées ou non avec HlpA-mKate2. A) Observation des souches *Gfp-mapZ-ΔExtra-ΔH1-2TA* et *Gfp-mapZ-ΔExtra-ΔH1-2TE*, *hlpA::hlpA-mKate2*. B) Observation des souches *Gfp-mapZ-ΔExtra-ΔH1-2TA*, *hlpA::hlpA-mKate2* et *Gfp-mapZ-ΔExtra-ΔH1-2TE*. Les cellules exprimant la sonde phosphoablative sont pointées en rouge et celles exprimant la sonde phosphomimétique sont pointées en bleu. L'expression des sondes est induite 15 minutes avec 12,5nM de ComS. Barre d'échelle : 2 μm. C) Vérification de la stabilité des sondes. Western-blot des extraits bruts des souches exprimant la sonde phosphoablative (2TA) et phosphomimétique (2TE) avec comme contrôle une souche exprimant la GFP. Les membranes sont révélées avec un anticorps anti-GFP et un anticorps anti-Enolase a été utilisé comme témoin de charge. D) Courbes de croissance des mutants exprimant les sondes phosphoablative et phosphomimétique.

protéine du divisome que FtsZ, nous avons construit des sondes MapZ délétées à la fois du domaine d'interaction avec FtsZ, appelé H1, et du domaine extracellulaire (Figure 34D).

Une étude précédente a montré que la délétion de la région H1 (GFP-MapZ- $\Delta$ H1) ne perturbe pas la localisation de MapZ au niveau des sites de division (Fleurie et al., 2014). De même, nous avons montré que la délétion conjointe de la région H1 et du domaine extracellulaire n'affecte pas la localisation de la sonde GFP-MapZ- $\Delta$ Extra- $\Delta$ H1 au niveau des sites actifs de division (Figure 35D). En effet, la sonde a un profil de localisation identique à celui de la sonde GFP-MapZ- $\Delta$ Extra.

A l'inverse, la délétion conjointe des régions H1 et H2 se traduit par une délocalisation totale de la sonde GFP-MapZ- $\Delta$ Extra- $\Delta$ H1-2 au profit d'une localisation diffuse dans la membrane (Figure 35E). La région H2, qui comprend les sites de phosphorylation, est essentielle pour la localisation de la sonde MapZ aux sites de division. On émet alors l'hypothèse que le domaine cytoplasmique de MapZ puisse interagir avec un ou plusieurs composants du divisome et que la phosphorylation de MapZ joue un rôle significatif dans cette interaction.

### **La phosphorylation de MapZ influence son interaction avec un ou plusieurs partenaires du divisome**

Afin de déterminer le rôle de la phosphorylation de MapZ dans l'interaction avec ses partenaires, deux autres sondes ont été construites. En plus de l'absence du domaine extracellulaire et du domaine d'interaction avec FtsZ, les deux thréonines phosphorylées sont mutées en acides glutamiques (mutations phosphomimétiques) dans la première sonde (2TE). Cela mime un état phosphorylé permanent de la protéine. La seconde est une sonde dite phosphoablative, pour laquelle les thréonines sont mutées en alanine (2TA), mimant un état déphosphorylé permanent de la protéine. Les souches exprimant les sondes (GFP-MapZ- $\Delta$ Extra $\Delta$ H1-2TE et GFP-MapZ- $\Delta$ Extra $\Delta$ H1-2TA) ont été observées au microscope. Afin d'être comparées dans les mêmes conditions expérimentales, l'expression des sondes a été induite en même temps et les mutants ont été observés sur une même lame de microscopie. Un marqueur du nucléoïde a été utilisé pour différencier les deux mutants. Ainsi, un des deux mutants exprime la protéine de liaison au nucléoïde HlpA fusionnée à la protéine fluorescente rouge mKate2.

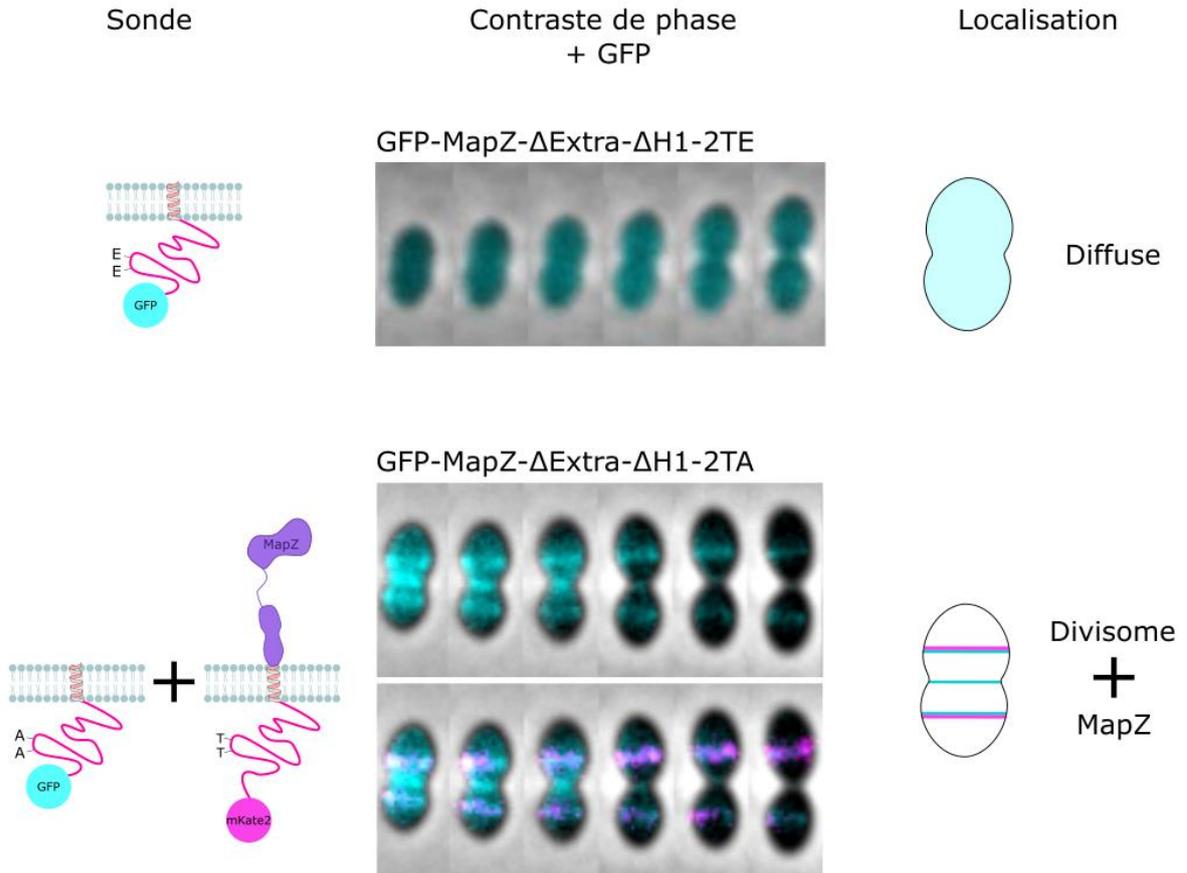


Figure 37 : Suivi en *time-lapse* de la localisation subcellulaire des sondes phosphomimétique (2TE) et phosphoablative (2TA). La localisation de la sonde 2TA est comparée avec celle de mKate2-MapZ exprimée au locus du gène. L'expression des sondes est induite 15 minutes avec 12,5 nM de ComS. Barre d'échelle : 2 $\mu$ m.

Les deux combinaisons (*Gfp-mapZ-ΔExtraΔH1-2TE* – *Gfp-mapZ-ΔExtraΔH1-2TA*, *hlpA::hlpA-mKate2* et *Gfp-mapZ-ΔExtraΔH1-2TE*, *hlpA::hlpA-mKate2* – *Gfp-mapZ-ΔExtraΔH1-2TA*) ont été testées pour s'affranchir de biais potentiels liés à la mutation du gène *hlpA*. Alors que la sonde GFP-MapZ-ΔExtraΔH1-2TA est localisée majoritairement au niveau des sites actifs de division, la sonde GFP-MapZ-ΔExtraΔH1-2TE est délocalisée au profit d'un marquage diffus (Figure 36AB). Afin de s'assurer que la localisation diffuse de la sonde phosphomimétique n'est pas due à une dégradation de la sonde dans le cytoplasme ou à un défaut d'expression du gène, des Western-Blots sur les extraits bruts des mutants ont été réalisés (Figure 36C). Les deux sondes sont bien exprimées et ne sont pas dégradées. De plus, la croissance des mutants a également été vérifiée (Figure 36D). La différence de localisation qui sera observée pour les deux sondes est donc biologiquement pertinente.

Des clichés d'un même champ microscopique ont été capturés toutes les 4 minutes afin de suivre la croissance d'une bactérie unique en vidéomicroscopie (Figure 37). La localisation de la sonde phosphoablative a été comparée avec la localisation de MapZ grâce à une souche de co-localisation exprimant mKate2-MapZ au locus et GFP-MapZ-ΔExtraΔH1-2TA. L'observation de cette souche en vidéomicroscopie montre une localisation de mKate2-MapZ caractéristique, avec deux anneaux qui marquent les frontières entre l'ancien et le nouveau pôle. Au contraire, la sonde phosphoablative GFP-MapZ-ΔExtraΔH1-2TA présente un schéma de localisation en trois bandes distinctes : elle se localise au niveau du septum de division ainsi qu'aux futurs sites de division. La sonde a donc un profil de localisation différent de mKate2-MapZ. Ce profil de division est caractéristique d'une protéine du divisome.

En conclusion, seule la forme phospho-ablative (2TA) est capable d'interagir avec le divisome. Cette observation montre que la phosphorylation du domaine cytoplasmique de MapZ influence son degré d'interaction avec un ou plusieurs partenaires, que nous avons cherché à identifier.

### **EzrA est un nouveau partenaire de MapZ**

Afin d'identifier de nouveaux partenaires de MapZ, une approche de co-immunoprécipitation avec la sonde phosphoablative GFP-MapZ-ΔExtraΔH1-2TA a été utilisée. L'expérience a été réalisée en présence d'un agent pontant, le dithiobis succinimidyl

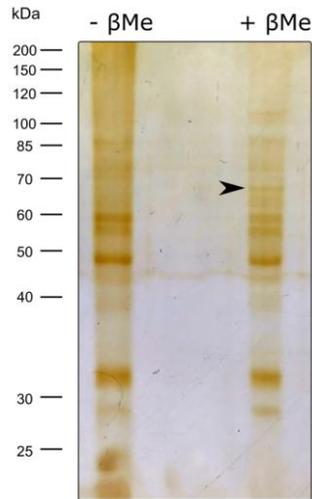


Figure 38 : Analyse SDS-PAGE montrant le profil de migration de l'échantillon issu de la co-immunoprécipitation de la protéine GFP-MapZ- $\Delta$ Extra- $\Delta$ H1-2TA. Les pistes correspondent à l'échantillon non traité (- $\beta$ Me) et traité (+  $\beta$ Me) au  $\beta$ -mercaptoéthanol.

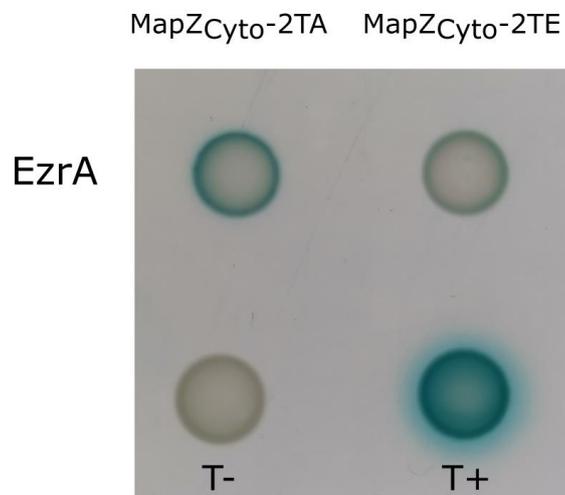


Figure 39 : Double hybride bactérien de l'interaction entre MapZ<sub>Cyto</sub>-2TA ou MapZ<sub>Cyto</sub>-TE et EzrA. Le témoin positif correspond à deux domaines leucine-zipper fusionnés aux fragments T18 et T25 de l'adénylate cyclase. Le témoin négatif correspond aux fragments T18 et T25 seuls. Cliché réalisé après 48 heures d'incubation.

propionate (DSP). Cet agent pontant de 12Å de longueur forme des liaisons covalentes entre des protéines proches. La protéine a été exprimée puis immobilisée sur billes d'agarose contenant un anticorps anti-GFP et éluée dans du tampon de charge (Laemmli, 1970) dépourvu de β-mercaptoéthanol. La moitié de l'éluat a ensuite été traité au β-mercaptoéthanol afin de casser les liaisons covalentes entre les protéines. Les deux échantillons ont été analysés par SDS-PAGE 10% et leurs profils de migration ont été comparés (Figure 38). De manière intéressante, une bande est présente dans la piste de l'échantillon traité au β-mercaptoéthanol mais absente de la piste de l'échantillon non traité. Cette bande pourrait correspondre à un interactant ayant été décroché du complexe formé avec MapZ et migrant dans le gel. La bande, de masse moléculaire comprise entre 60 et 70 kDa, a été découpée et analysée par spectrométrie de masse en tandem couplée à une chromatographie liquide (LC-MS/MS). Cette analyse a été réalisée par la plateforme Protein Science Facility de notre unité. Parmi les protéines identifiées, on retrouve des protéines impliquées dans le métabolisme général (pyruvate oxydase, GFAT), la régulation de la transcription et de la traduction (ribonucléase J, facteur de terminaison 3), la biosynthèse d'acides aminés ou de bases (ATP synthase, CTP synthase, Aspartate-ARNt ligase, Proline-ARNt ligase), la virulence (CapD, endopeptidase O), la sécrétion de protéines (SecA) et enfin la division cellulaire (EzrA) (Tableau 6). Dans la liste on retrouve la protéine du divisome, EzrA, de poids moléculaire compatible avec la bande découpée. Elle a été identifiée avec un peptide unique et une couverture de séquence de 3%. EzrA étant une protéine impliquée dans la division cellulaire du pneumocoque, nous avons donné la priorité à l'étude de l'interaction entre MapZ et EzrA dans le cadre de ce projet.



Numéro d'ordre	Description	Couverture (%)	Peptides uniques	Score Sequest HT	MM (kDa)
Q8DQJ4	Pyruvate oxidase, Spr0642	35	14	41,38	65,2
Q8DRA8	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase (GFAT), Spr0245	16	7	19,21	65,5
Q8DQR3	Ribonuclease J, Spr0538	7	3	6,34	61,2
Q8DQE5	EzrA, Spr0716	3	1	2,76	66,5
Q8DNW9	Endopeptidase O, Spr1491	3	1	2,5	71,9
Q8CWN4	Aspartate-ARNt ligase, Spr1924	2	1	2,43	66,3
Q8DQY0	CTP synthase, Spr0438	3	1	2,43	59,3
Q8DNT8	SecA, Spr1544	1	1	2,35	95,0
Q8DRB0	Proline-ARNt ligase, Spr0243	3	1	2,27	68,7
Q8DR09	Facteur de terminaison 3, Spr0396	2	1	2,19	58,5
Q8DRJ2	CapD, Spr0092	1	1	2,08	69,3
Q8DP44	ATP synthase sous-unité $\beta$ , Spr1360	2	1	1,92	50,9

Tableau 6 : Résultats de l'analyse en LC-MS/MS de la bande retenue, de masse moléculaire comprise entre 60 et 70 kDa. Numéro d'ordre et description : identifiant et description de la protéine. Couverture : Couverture de séquence (%). Peptides uniques : nombre de séquences peptidiques uniques à un groupe de protéine. Score Sequest HT : nombre de peptides utilisés par l'algorithme de recherche SEQUEST HT et somme de tous les scores individuels obtenus pour chaque peptide. MM : Masse moléculaire (kDa).

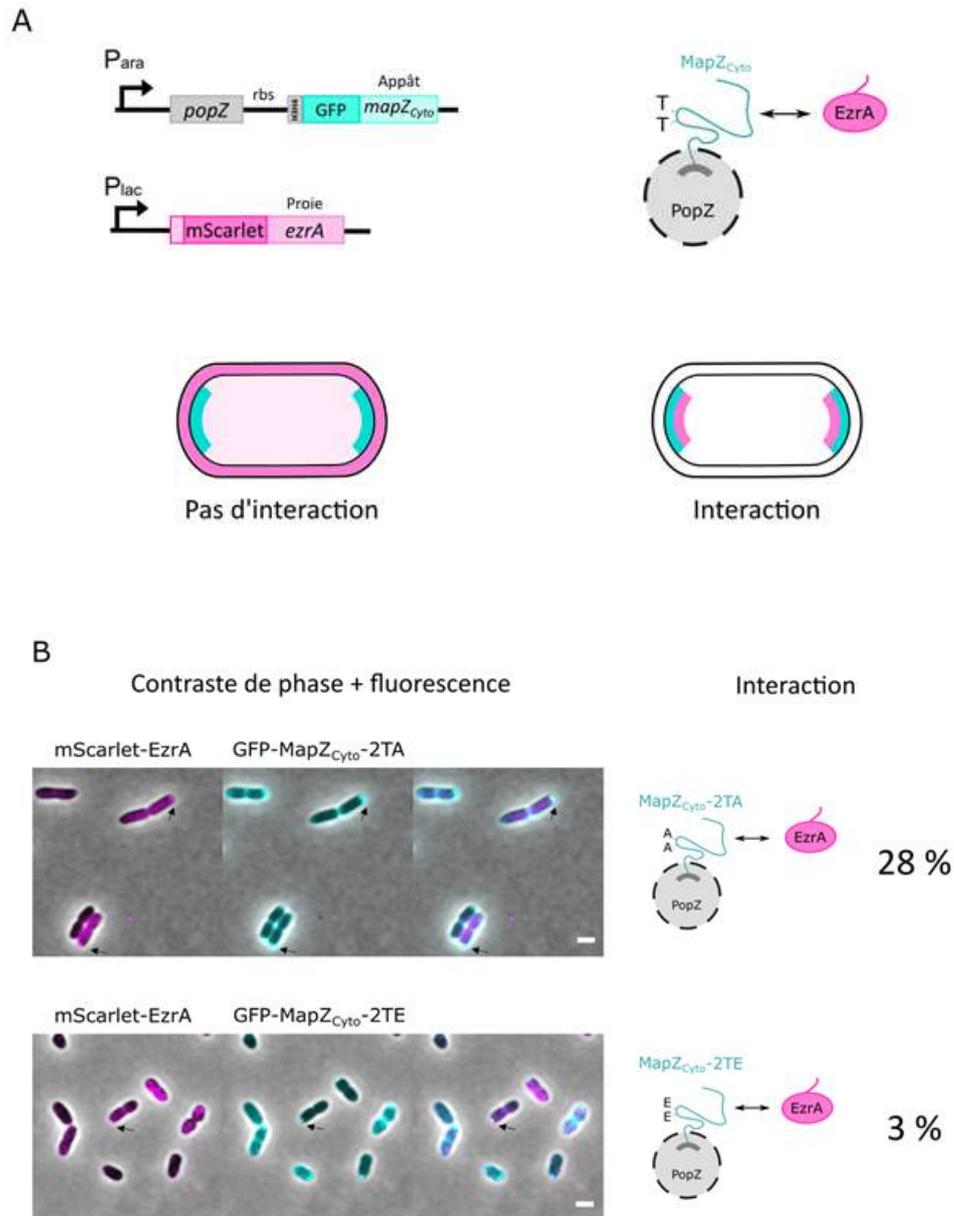


Figure 40 : Expérience de double hybride en POLAR. A) Principe. Une souche de *E. coli* est co-transformée avec deux plasmides. Un plasmide exprime la protéine appât (MapZ) fusionnée à la GFP et au peptide H3H4. Ce même plasmide permet l'expression de PopZ. Le second plasmide exprime la protéine proie (EzrA) fusionnée à la mScarlet. Si l'interaction est positive, les protéines forment des foci colocalisés aux pôles des cellules. En l'absence d'interaction, seule la protéine appât recrutée par PopZ présente une localisation polaire. B) Résultats. MapZ<sub>Cyto</sub>-2TA (panel du haut) interagit avec EzrA. On retrouve des foci co-localisés dans 28% des cellules comptées, contre 3% pour l'expérience avec MapZ<sub>Cyto</sub>-2TE (panel du bas). Barre d'échelle : 2µm.

## EzrA interagit préférentiellement avec MapZ déphosphorylée

Afin de confirmer l'interaction entre MapZ et EzrA et de déterminer si celle-ci est directe et modulée par le niveau de phosphorylation de MapZ, nous avons utilisé deux systèmes de détection protéine-protéine chez la bactérie *E. coli*. Le double hybride bactérien (BACTH) (Euromedex) et le système POLAR (PopZ-linked apical recruitment) (Lim & Bernhardt, 2019).

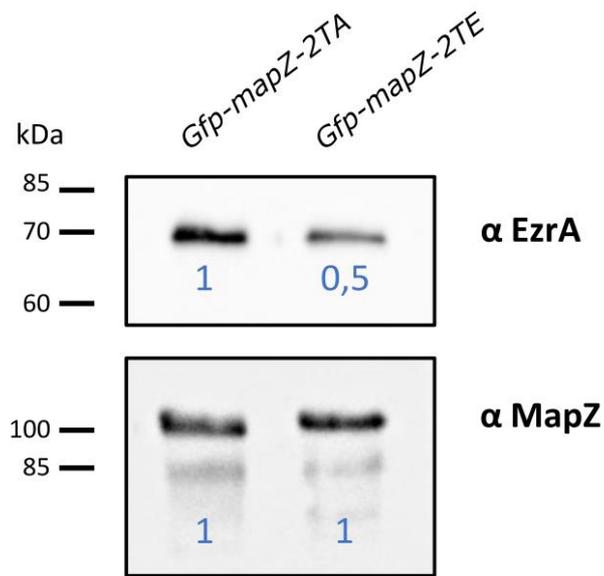
- Validation de l'interaction en double hybride bactérien

Afin de tester l'interaction en double hybride bactérien, des plasmides exprimant soit le fragment T18, soit le fragment T25 de l'adénylate cyclase fusionné au domaine N-terminal de MapZ<sub>Cyto</sub> et de EzrA ont été utilisés. Seule la combinaison entre les formes MapZ<sub>Cyto</sub>-2TA et EzrA se caractérise par la présence d'une coloration bleue significative après 48 heures, en comparaison à la version MapZ<sub>Cyto</sub>-2TE pour laquelle une légère coloration bleue apparaît au même temps d'incubation (Figure 39). Par conséquent, le domaine cytoplasmique de MapZ semble interagir avec EzrA, préférentiellement sous sa forme déphosphorylée.

- Validation de l'interaction en système POLAR

Nous avons confirmé cette interaction au moyen d'une autre technique de double hybride appelée POLAR. La méthode POLAR (PopZ-Linked Apical Recruitment) est une méthode de détection d'interaction protéine-protéine dans la bactérie hôte *E. coli* (Lim & Bernhardt, 2019). Ce système repose sur l'expression de la protéine PopZ de *Caulobacter Crescentus*, qui forme spontanément des foci cytoplasmiques aux pôles des cellules chez *E. coli* (Bowman et al., 2008 ; Ebersbach et al., 2008 ; Laloux and Jacobs-Wagner, 2013). Le système utilise également le domaine d'homo-oligomérisation de PopZ, nommé H3H4 (de 52 acides aminés), qui peut être fusionné à des protéines hétérologues pour les recruter aux foci formés par PopZ (Laloux & Jacobs-Wagner, 2013).

En principe, PopZ et H3H4-GFP fusionné à la protéine appât sont produits à partir d'un plasmide à moyen nombre de copies sous opéron, sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose (P<sub>Ara</sub>). Un autre plasmide permet l'expression de la protéine proie, fusionnée à la protéine fluorescente rouge mScarlet, sous le contrôle du promoteur inductible à l'IPTG (P<sub>Lac</sub>) (Bindels et al., 2016). Les deux plasmides sont co-transformés dans



\* Intensité du signal normalisée (ImageJ)

Figure 41 : Western blot des co-immunoprécipitations des protéines GFP-MapZ-2TA et GFP-MapZ-2TE. Les membranes ont été révélées avec un anticorps anti-EzrA et un anticorps anti-MapZ a été utilisé comme témoin de charge protéique. L'intensité du signal de chaque bande a été mesurée grâce au logiciel ImageJ et normalisé.

une souche de *E. coli*. L'interaction protéine-protéine est visualisée par microscopie à épifluorescence, en observant la co-localisation des protéines fusionnées à la mScarlet et à la GFP (Figure 40A). Après co-transformation des plasmides coexprimant soit MapZ<sub>Cyto</sub>-2TA soit MapZ<sub>Cyto</sub>-2TE et EzrA, une culture des cellules en milieu M9 a été réalisée, comme décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les cellules ont été observées au microscope à épifluorescence et les foci GFP et mScarlet co-localisés ont été comptés. Alors que seulement 3% des cellules issues de la co-transformation MapZ<sub>Cyto</sub>-2TE/EzrA présentaient au moins un focus co-localisé, il y en avait 28% pour MapZ<sub>Cyto</sub>-2TA/EzrA (Figure 40B). Ainsi, nous avons démontré, par une seconde méthode d'interaction, que EzrA interagit avec MapZ, préférentiellement lorsqu'elle est sous forme non phosphorylée.

- Confirmation de l'interaction *in vivo*

Les deux systèmes de double hybride utilisés nous ont permis de montrer que l'interaction entre MapZ et EzrA est directe et modulée par le niveau de phosphorylation de MapZ. Afin de montrer que cette interaction est également modulée *in vivo*, nous avons réalisé une expérience de co-immunoprécipitation dans des souches de *S. pneumoniae*. Après culture des deux souches de pneumocoque exprimant les protéines GFP-MapZ-2TA ou GFP-MapZ-2TE au locus, nous avons récupéré le culot cellulaire et réalisé une co-immunoprécipitation des protéines sans agent pontant, en utilisant des billes d'agarose contenant des anticorps anti-GFP. Les éluats issus des deux co-immunoprécipitations ont été analysés sur SDS-PAGE et analysé par Western-Blot (Figure 41). La membrane a été révélée avec un anticorps anti-EzrA. Le signal d'immunofluorescence mesuré pour EzrA dans la piste MapZ-2TA est deux fois plus important que celui mesuré pour MapZ-2TE. Une membrane révélée avec un anticorps anti-MapZ a été utilisée pour s'assurer que la charge protéique était équivalente dans les deux pistes. Nous avons ainsi confirmé *in vivo* que l'interaction entre MapZ et EzrA est dépendante du niveau de phosphorylation de MapZ.

### **Caractérisation des domaines d'interaction de EzrA**

Afin de mieux préciser l'interaction entre MapZ et EzrA, nous avons décidé de préciser la zone d'interaction entre les deux protéines. EzrA est une protéine similaire aux spectrines eucaryotes. Un domaine spectrine est composé de deux longues chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  associées

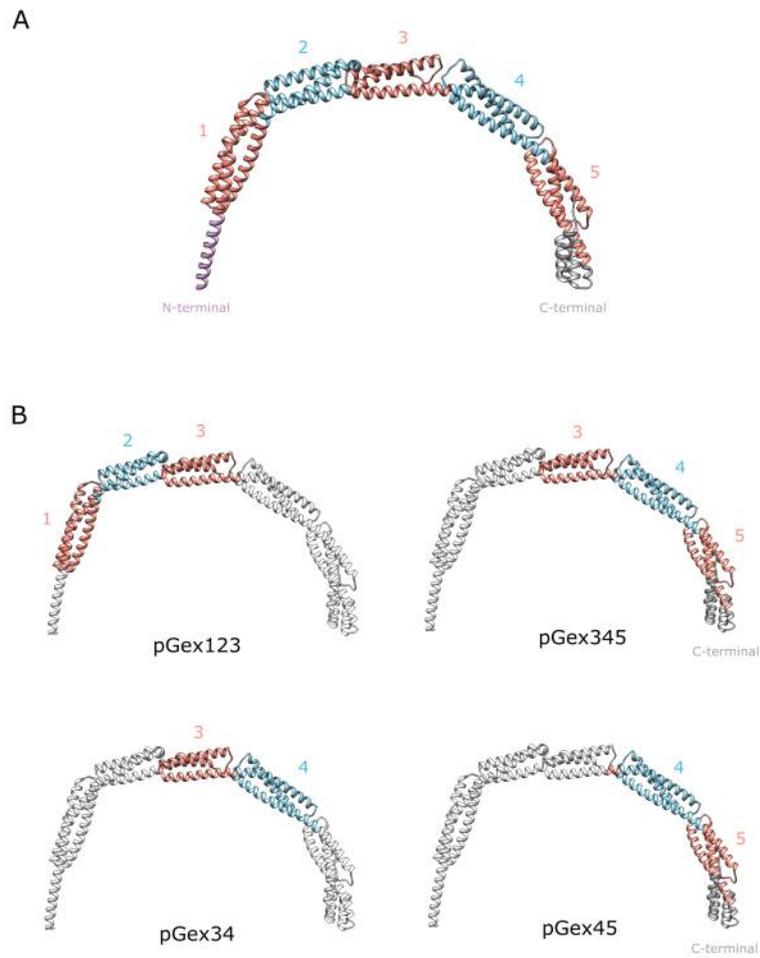


Figure 42 : A) Représentation structurale de EzrA modélisée par Alphafold2. Les domaines spectrine sont colorés en bleu et en orange, les domaines N-terminal et C-terminal sont représentés en violet et en gris respectivement. B) Modélisation des formes tronquées de EzrA utilisées pour les tests d'interaction. La partie exprimée est colorée et la partie tronquée est représentée en blanc.

côte à côte en tétramères ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub>. EzrA est ainsi composée d'une répétition de 5 domaines spectrines, d'un domaine N-terminal contenant une hélice amphipathique permettant de se lier à la membrane et d'un domaine C-terminal (Figure 42A). Pour déterminer quel(s) domaine(s) interagit(ssent) avec MapZ, plusieurs formes tronquées de EzrA ont été produites. Les plasmides d'expression ont été fournis par le Dr Cécile Morlot (IBS, Grenoble) (Figure 42B). Dans un premier temps, nous avons choisi de tester l'interaction entre ces différentes formes de EzrA et MapZ<sub>Cyto</sub>-2TA par thermophorèse à microéchelle (MST). Nous avons marqué MapZ<sub>Cyto</sub>-2TA à l'aide de deux kits de marquages fournis, le RED-NHS et le 6-His RED-tris-NTA (NanoTemper). Les marquages n'étaient pas satisfaisants car ils rendaient la protéine instable. Les tests préliminaires d'interaction ne permettaient donc pas de conclure. L'interaction a donc été testée en résonance plasmonique de surface (SPR), ce qui nous a permis d'utiliser des protéines de MapZ non marquées et donc plus stables. Nous avons purifié les protéines (Figure 43) et chaque forme de EzrA a été fixée sur une puce de capteur CM5. Des concentrations croissantes de MapZ<sub>Cyto</sub>-2TA ont ensuite été injectées sur la surface de la puce. Des sensorgrammes ont été générés, qui permettent de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées dans la cellule de microfluidique. Les graphiques, représentant le signal en unité de résonance (RU) en fonction du temps, ont ensuite été comparés à plusieurs modèles d'interaction. Le modèle le plus satisfaisant était le modèle d'interaction 1:1, pour lequel une molécule de EzrA interagirait avec une molécule de MapZ. Les constantes d'affinité ( $K_D$ ) ont été mesurées pour chaque expérience et comparées (Figure 44). Dans un premier temps, deux formes de EzrA ont été testées : pGex123 et pGex345. pGex123 exprime les domaines spectrines 1, 2 et 3 et pGex345 exprime les domaines spectrines 3, 4, 5 et le domaine C-terminal (Figure 42B). Les deux formes interagissent avec MapZ<sub>Cyto</sub>-2TA, avec un  $K_D$  comparable, de l'ordre de  $10^{-7}$  M. Ces résultats suggèrent que : (i) tous les domaines spectrine de EzrA sont capables d'interagir avec MapZ ou (ii) le domaine spectrine commun aux deux versions testées (Spectrine 3) est responsable de l'interaction. Afin de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses, nous avons voulu tester l'interaction entre MapZ<sub>Cyto</sub>-2TA et le domaine spectrine 3 de EzrA. Cependant, nous n'avons pas réussi à surproduire le domaine spectrine unique, celui-ci n'étant probablement pas stable. Nous avons donc testé l'interaction de MapZ<sub>Cyto</sub>-2TA avec deux autres formes tronquées plus longues de EzrA comprenant ou non le domaine spectrine 3.

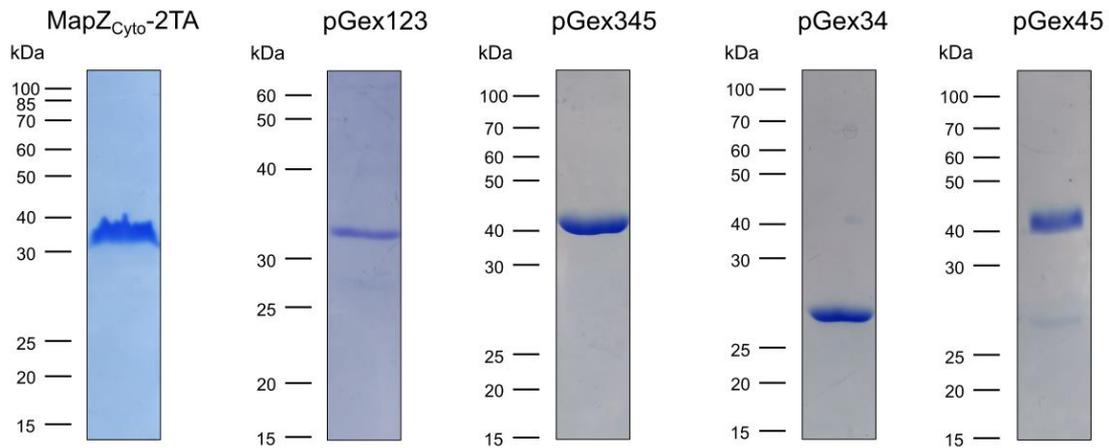


Figure 43 : Gel SDS-PAGE des protéines MapZ<sub>Cyto</sub>-2TA et des quatre formes tronquées de EzrA purifiées. Les gels ont été colorés avec du bleu de coomassie.

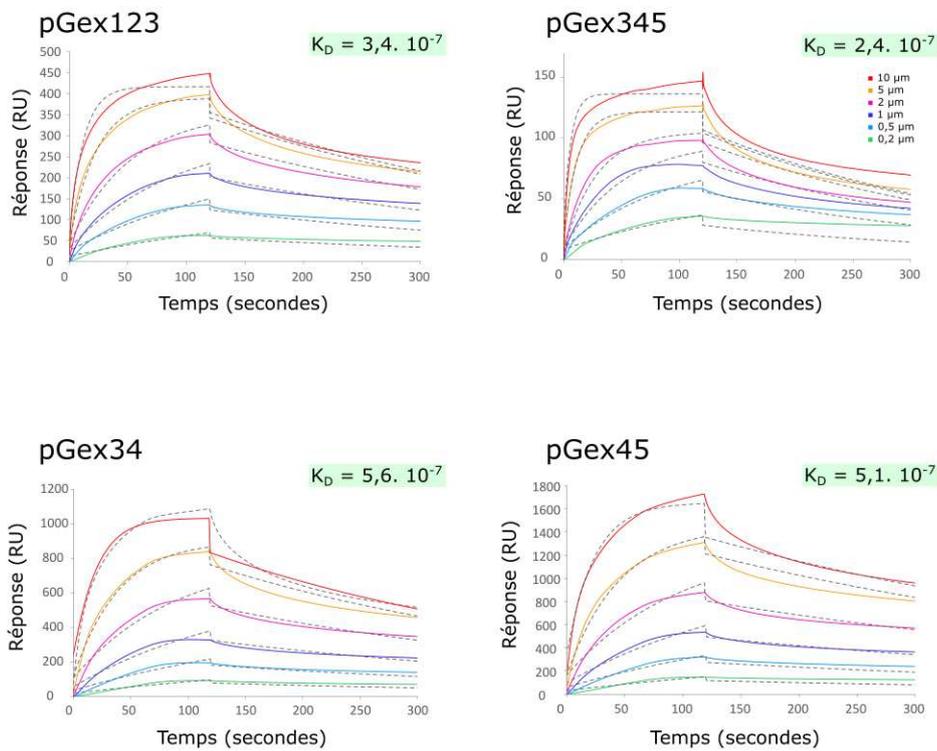


Figure 44 : Résultats des expériences de SPR. Les sensorgrammes pour les tests d'interaction entre MapZ<sub>Cyto</sub>-2TA et les quatre formes tronquées de EzrA sont représentés. Les lignes pleines et colorées représentent les résultats de l'interaction et les lignes discontinues et grises correspondent au modèle 1 :1. Les constantes d'affinité ( $K_D$ ) sont notées au-dessus de chaque sensorgramme.

pGex34 exprime les domaines spectrines 3 et 4 et pGex345 exprime les domaines spectrines 4, 5 et le domaine C-terminal (Figure 42B). pGex34 et pGex45 interagissent avec MapZ avec des  $K_D$  comparables aux deux précédents, de l'ordre de  $10^{-7}$  M. Cela suggère que plusieurs ou tous les domaines spectrine de EzrA sont capables d'interagir avec MapZ.

### **Localisation de EzrA, StkP et MapZ**

Cette étude a permis d'identifier un nouveau partenaire de MapZ, la protéine du divisome EzrA, qui interagit préférentiellement lorsque MapZ est déphosphorylée. Les protéines interagissent probablement via plusieurs domaines spectrine de EzrA et via le domaine cytoplasmique de MapZ. Afin de comprendre quelle est la pertinence biologique de cette interaction, nous avons voulu comparer les dynamiques des protéines MapZ, EzrA et de la sérine-thréonine kinase StkP. Pour cela, nous avons construit des souches exprimant des fusions fluorescentes de ces protéines au locus, afin de les co-localiser deux à deux (Figure 45). Les protéines ont été fusionnées à des protéines fluorescentes rouges ou vertes et la dynamique de chacune a été visualisée au moyen de cartes de chaleur. Les cellules totales ont été triées par taille afin de déterminer 5 stades, représentatifs de l'état d'avancement de la division cellulaire. Le signal de fluorescence sur les images et sur les cartes de chaleur a été coloré en cyan (MapZ), magenta (StkP) ou jaune (EzrA) afin de permettre une distinction optimale des couleurs et de faciliter la compréhension des résultats. La superposition des cartes de chaleur des protéines fluorescentes nous a permis de déterminer la fenêtre pendant laquelle MapZ non phosphorylée (éloignée de StkP, cette hypothèse est discutée dans la section Discussion) pourrait interagir avec EzrA (Figure 45). Cette fenêtre correspond au stade IV de la division cellulaire, pour laquelle MapZ co-localise avec EzrA mais pas avec StkP, et donc potentiellement non phosphorylée. MapZ et EzrA pourraient donc interagir dans les stades tardifs de la division cellulaire.

Pour corroborer ces observations et offrir une représentation plus visuelle, nous avons co-localisé simultanément les trois protéines au sein d'un même mutant. Cette expérience a nécessité la construction de fusions avec trois protéines fluorescentes distinctes, soigneusement choisies pour que les spectres d'émission et d'excitation respectifs ne soient pas superposés. De plus, il a été impératif d'obtenir un signal de fluorescence optimal à partir de ces fusions, garantissant la possibilité de capturer des images avec une intensité de

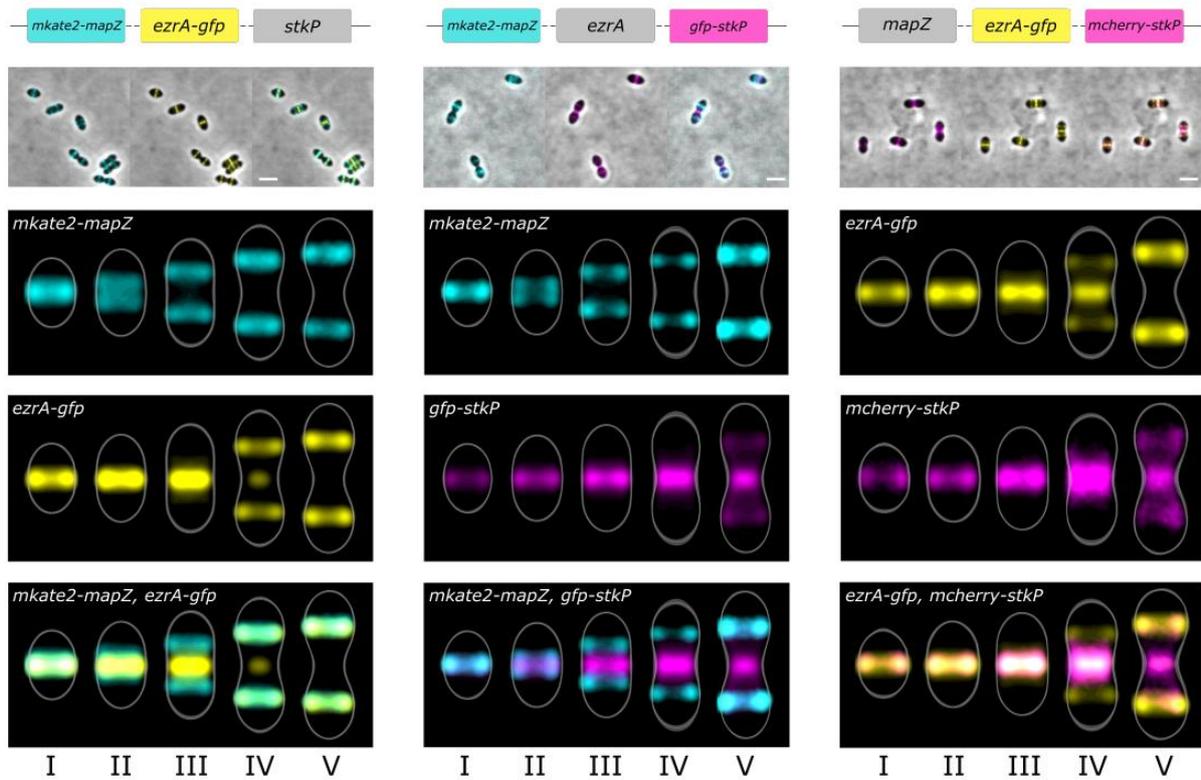


Figure 45 : Co-localisation des protéines MapZ et EzrA (colonne de gauche), MapZ et StkP (colonne du milieu) et EzrA et StkP (colonne de droite). Pour chaque expérience, le fond génétique des mutants, une image de microscopie et des cartes de chaleur sont représentées. Chaque expérience de colocalisation est réalisée en triplicat, avec 300 cellules par expérience. Barre d'échelle : 2 $\mu$ m.

signal suffisante. Pour ce faire, une série de combinaisons entre protéines fluorescentes et protéines d'intérêt a été explorée, en utilisant également différents *linkers* pour relier les deux protéines. Après de nombreuses tentatives, nous avons réussi à identifier une combinaison de trois protéines fluorescentes dont les spectres d'excitation et d'émission ne se chevauchent pas, et qui présentent une intensité de fluorescence satisfaisante : mECFP-MapZ ( $\lambda_{em}$ : 475 nm ;  $\lambda_{ex}$ : 433 nm) ; EzrA-mYFP ( $\lambda_{em}$ : 528 nm ;  $\lambda_{ex}$ : 515 nm) ; mCherry-StkP ( $\lambda_{em}$ : 610 nm ;  $\lambda_{ex}$ : 587 nm). Parallèlement, la croissance des mutants exprimant ces fusions ainsi que la stabilité de ces dernières ont également été vérifiées (Figure 46). Les résultats de la colocalisation des trois protéines ont permis d'illustrer le modèle de travail et sont présentés dans la section Discussion de ce manuscrit.

### **Dialogue moléculaire et pertinence biologique**

Dans l'optique d'approfondir la caractérisation de l'interaction entre EzrA et MapZ non phosphorylée, nous avons voulu évaluer l'impact de la phosphorylation constitutive de MapZ sur la dynamique de EzrA. Pour cela, nous avons suivi la dynamique de la protéine fluorescente EzrA-GFP dans différentes souches mutées dans le gène *mapZ* au locus (WT,  $\Delta mapZ$ , *mapZ-2TA*, *mapZ-2TE*). Pour ce faire, nous avons utilisé la microscopie à champ évanescent, aussi appelée TIRF (Total internal reflection fluorescence). Cette technique de microscopie à fluorescence permet d'obtenir une grande série d'images tout en limitant le signal fluorescent d'arrière-plan et les effets de photoblanchiment. Ainsi, des images de cellules vivantes ont été capturées toutes les 10 secondes pendant 50 minutes. Afin de visualiser facilement les résultats, des kymographes ont été générés (Figure 37). Ces diagrammes synthétisent l'ensemble des images capturées, empilées pour créer une représentation visuelle. Ils nous permettent de suivre la dynamique d'une protéine membranaire au sein d'une même cellule en croissance, pendant plus d'un cycle de division cellulaire.

Les dynamiques de EzrA-GFP dans une souche WT,  $\Delta mapZ$ , *mapZ-2TA* et *mapZ-2TE* ont été comparées. La dynamique de EzrA-GFP dans une souche sauvage suit un mouvement de *treadmilling* (Perez et al., 2019 ; Perez et al., 2021) et est caractéristique d'une protéine du divisome : un anneau au début de la division cellulaire (localisation septale) qui se sépare ensuite pour migrer vers les futurs sites de division cellulaire (localisation équatoriale).

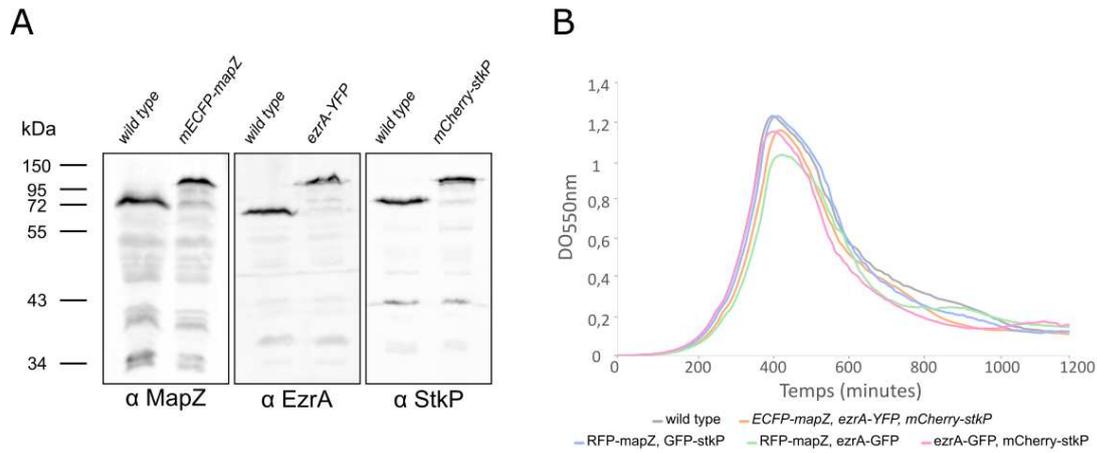


Figure 46 : A) Western-blot des extraits bruts des mutants exprimant les fusions avec des protéines fluorescentes. B) Courbe de croissance des mutants de co-localisation.

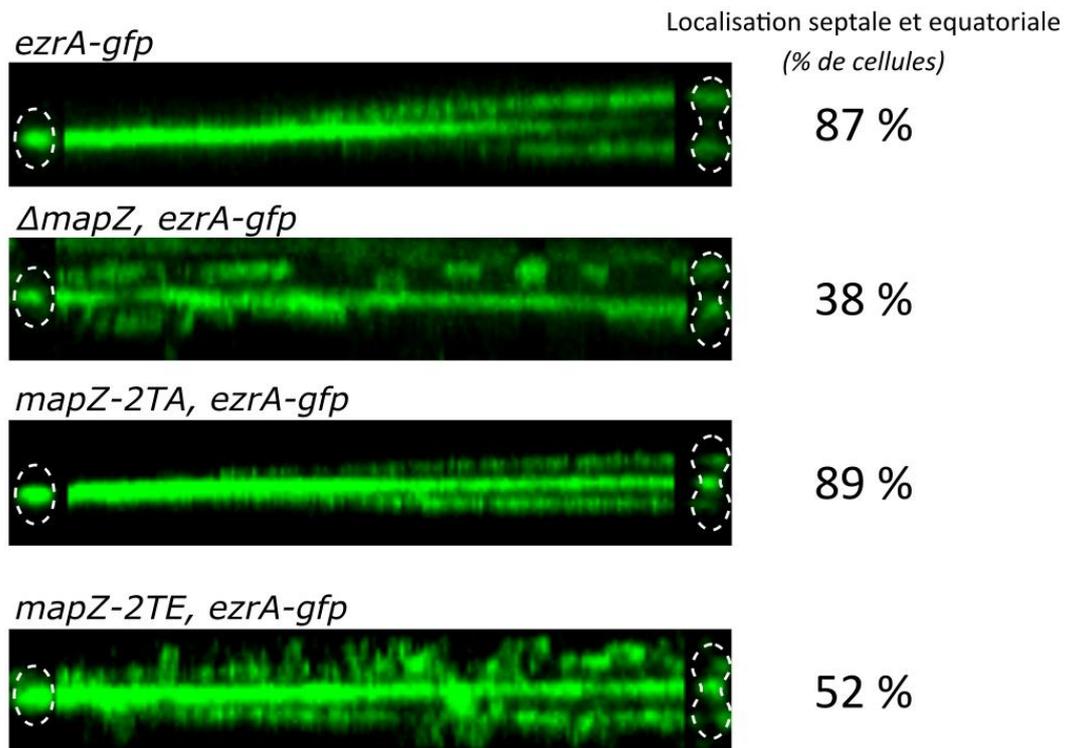


Figure 47 : Kymographes représentant la dynamique de EzrA-GFP suivie en TIRF pour une souche WT, un mutant  $\Delta$ *mapZ* et les mutants phosphoablatifs et phosphomimétiques *mapZ-2TA* et *mapZ-2TE*. Un cliché a été réalisé toutes les 10 secondes pendant 50 minutes. Les contours cellulaires sont marqués en pointillés blanc au début et à la fin de chaque expérience. A droite de chaque kymographe est noté la proportion de cellules présentant une localisation septale et équatoriale de EzrA. Le comptage a été réalisé en triplicat, sur un échantillon de 500 cellules pour chaque mutant.

Ce processus se traduit, sur le kymographe, par une bande unique se subdivisant en trois bandes distinctes. 87% des cellules comptées présentent une dynamique de EzrA normale, c'est à dire avec une localisation septale et équatoriale. Dans le cas du mutant  $\Delta mapZ$ , le kymographe montre un déplacement discontinu des protéines, caractérisé par des mouvements aléatoires, aboutissant finalement à des anneaux EzrA qui n'atteignent pas les sites de division prévus (Figure 47). Dans ce mutant, seulement 38% des cellules présentent une dynamique normale. On peut en conclure qu'en l'absence de MapZ, EzrA ne parvient pas à localiser correctement le site de division cellulaire. En ce qui concerne les mutants de phosphorylation, la dynamique de EzrA-GFP dans un mutant  $mapZ-2TA$  est comparable à celle dans une souche sauvage (89% de cellules présentent une dynamique normale). En revanche, cette dynamique est perturbée dans un mutant  $mapZ-2TE$ . En effet, le kymographe du mutant phosphomimétique montre une dynamique comparable à un  $\Delta mapZ$ , avec seulement 52% des cellules pour lesquelles EzrA parvient à se localiser correctement. Ainsi, EzrA identifie plus difficilement le site de division lorsque MapZ est phosphorylée de façon permanente.

Grâce à ces conclusions sur la localisation des protéines et la dynamique de EzrA, nous avons élaboré un modèle visant à expliquer la dynamique et la signification biologique de cette interaction. Les hypothèses que nous avons formulées ainsi que le modèle qui en a résulté sont exposés dans la section Discussion de ce manuscrit.



## Partie II – Caractérisation de la protéine de morphogénèse CopD et rôle dans la division cellulaire de *Streptococcus pneumoniae*

Les protéines de liaison à la pénicilline (PBPs) sont des protéines intervenant dans l'assemblage du peptidoglycane, composant majeur de la paroi bactérienne. Cependant, leur régulation est encore peu connue. Dans cette étude, j'ai caractérisé la protéine de fonction inconnue, Spr1400. J'ai montré que cette protéine interagit avec les PBPs de classe A et B PBP1a et PBP2b et qu'elle régule leur dynamique spatio-temporelle. J'ai donc nommé cette protéine CopD, pour Coordinator of PBP1a and 2b dynamics.

J'ai d'abord montré que la délétion du gène *copD* conduit à un élargissement des cellules sans modification de leur longueur. En fusionnant CopD à une sonde fluorescente, j'ai également montré que CopD est une protéine septale, se relocalisant tardivement aux futurs sites de division cellulaire.

D'autre part, une analyse en double hybride bactérien a permis d'identifier une interaction avec les PBPs PBP1a et PBP2b, deux PBPs intervenant dans la régulation de l'élongation cellulaire. Ces interactions ont été confirmées par co-immunoprécipitation. Ensuite, des expériences de thermophorèse à micro-échelle couplées à des expériences de double hybride bactérien ont permis de montrer que ce sont les domaines transmembranaires et/ou cytoplasmiques des protéines qui sont responsables de l'interaction. Des expériences de co-localisation des protéines CopD et PBP1a ou PBP2b a permis de montrer que les trois protéines co-localisent tout au long de la division cellulaire.

Enfin, l'interaction entre CopD et les PBPs a été caractérisée en comparant les dynamiques de PBP1a et PBP2b fusionnées à des protéines fluorescentes dans des mutants de délétion de CopD, en comparaison à une souche sauvage. Ces expériences nous ont permis de montrer qu'en l'absence de CopD, PBP1a et PBP2b persistent plus longtemps au septum de division avant de se relocaliser aux futurs sites de division.

L'ensemble de ces résultats, couplés à des études récentes sur la composition, l'architecture et la synthèse de la paroi cellulaire, ont permis d'établir un modèle du rôle de CopD dans la morphogénèse du pneumocoque et dans la régulation spatio-temporelle de PBP1a et PBP2b.



# The morphogenic protein CopD controls the spatio-temporal dynamics of PBP1a and PBP2b in *Streptococcus pneumoniae*

Cassandra Lenoir,<sup>1</sup> Anaïs Pelletier,<sup>1</sup> Sylvie Manuse,<sup>1</sup> Hugo Millat,<sup>1</sup> Adrien Ducret,<sup>1</sup> Anne Galinier,<sup>2</sup> Thierry Doan,<sup>3</sup> Christophe Grangeasse<sup>1</sup>

**AUTHOR AFFILIATIONS** See affiliation list on p. 13.

**ABSTRACT** Penicillin-binding proteins (PBPs) are key to the assembly of peptidoglycan, the major component of the bacterial cell wall. Although several PBP-specific regulatory proteins have been identified in different species, little is known about how the activity of PBPs is controlled and coordinated during the cell cycle. In this study, we characterize the unknown function protein Spr1400 and demonstrate its regulatory function on two PBPs in *Streptococcus pneumoniae*. For that, we use a combination of technics ranging from bacterial genetics and protein biochemistry to microscopy imaging. First, we show that pneumococcal Spr1400 localizes late to the cell division septum. Furthermore, deletion of *spr1400* results in wider cells. Using co-immunoprecipitation and bacterial two hybrid (B2H), we observe that Spr1400 interacts with two PBPs, the class A PBP PBP1a and the class B PBP PBP2b, which are required for cell elongation. Microscale thermophoresis combined with B2H further reveals that these interactions occur through their transmembrane domains. We also show that Spr1400 co-localizes with PBP1a and PBP2b throughout the cell cycle. Strikingly, deletion of *spr1400* alters the dynamics of PBP1a and PBP2b. Indeed, the two PBPs persist longer at the division site and localize later at the division site of daughter cells. Collectively, these data demonstrate that Spr1400, thus named CopD for coordinator of PBP1a and 2b dynamics, is a spatio-temporal regulator of PBP1a and PBP2b required for pneumococcal morphogenesis.

**IMPORTANCE** Penicillin-binding proteins (PBPs) are essential for proper bacterial cell division and morphogenesis. The genome of *Streptococcus pneumoniae* encodes for two class B PBPs (PBP2x and 2b), which are required for the assembly of the peptidoglycan framework and three class A PBPs (PBP1a, 1b and 2a), which remodel the peptidoglycan mesh during cell division. Therefore, their activities should be finely regulated in space and time to generate the pneumococcal ovoid cell shape. To date, two proteins, CozE and MacP, are known to regulate the function of PBP1a and PBP2a, respectively. In this study, we describe a novel regulator (CopD) that acts on both PBP1a and PBP2b. These findings provide valuable information for understanding bacterial cell division. Furthermore, knowing that  $\beta$ -lactam antibiotic resistance often arises from PBP mutations, the characterization of such a regulator represents a promising opportunity to develop new strategies to resensitize resistant strains.

**KEYWORDS** peptidoglycan, penicillin-binding proteins, cell division, cell morphogenesis, *Streptococcus pneumoniae*

Most bacteria are surrounded by an extracellular cell wall whose composition varies from species to species (1). An essential and conserved component of the cell wall is the peptidoglycan (PG), which forms an intricate network of glycan strands cross-linked by short peptides, and ensures the shape and physical integrity of the cell

**Editor** Kimberly A. Kline, Université de Genève, Geneva, Switzerland

Address correspondence to Christophe Grangeasse, christophe.grangeasse@ibcp.fr.

The authors declare no conflict of interest.

See the funding table on p. 14.

**Received** 2 June 2023

**Accepted** 25 July 2023

**Published** 20 September 2023

Copyright © 2023 Lenoir et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

(2, 3). PG assembly begins at the inner leaflet of the membrane with the synthesis of a building block (Lipid II) by the Mur proteins (4). Lipid II is composed of a disaccharide of GlcNac-MurNac and a pentapeptide containing D- and L-amino acids and whose composition varies among species. Lipid II is then flipped across the membrane by the flippase MurJ and polymerized into a giant cage-like polymer by two types of PG synthases, the penicillin-binding proteins (PBPs) and the shape, elongation, division, and sporulation (SEDS) proteins (4–6).

Glycan strand polymerization and cross-linking is enzymatically well characterized. By contrast, the assembly mechanisms of the PG three-dimensional structure are diverse and complex among bacteria, not only to accommodate their specific cell shape and growth mode but also to ensure cell integrity during the cell cycle (7, 8). For that, bacteria have evolved a diversity of strain-specific proteins, regulatory processes, and notably different SEDSs and PBPs to direct the assembly of PG at the division septum and/or the lateral side and/or the pole (4, 9). Classically, the glycosyltransferase (GT) activity of two SEDS homologs, FtsW and RodA, is involved in the polymerization of glycan strands required for cell division and elongation, respectively (10, 11). However, the production of the PG layer may require multiple SEDS, as in *Listeria monocytogenes*, which requires two FtsW and three RodA (12). This is also true for the PBPs as their number also varies from species to species (13). In addition, while all PBPs possess a transpeptidase (TP) activity that cross-links the glycan strands by peptide bridges, some also possess a TG activity allowing glycan strand polymerization. PBPs are thus classified in two distinct families, the class A (aPBPs) which possesses both TP/TG activities and the class B (bPBPs) which possesses only the TP activity (13). The current model proposes that bPBPs work together with the SEDS to build the PG primary framework whereas the aPBPs are required for PG remodeling to mature the primary PG framework during cell growth (11, 14). To mature the PG layer, the activity of PBPs should therefore be tightly coordinated in space and time. The characterization of LpoA, LpoB, CpoB, and FtsN has pioneered this aspect by demonstrating that these three proteins control the two class A PBP1a and PBP1b in *Escherichia coli* (15).

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is a Gram-positive bacterial pathogen responsible for several diseases such as otitis, meningitis, and pneumonia and that is commonly found in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (16, 17). It is also a major model to study bacterial cell division and morphogenesis (18–20). In *S. pneumoniae*, PG is assembled only at midcell by the cell division machinery (divisome) (19). It is proposed that the bPBP/SEDS pairs PBP2x/FtsW and PBP2b/RodA assemble two types of primary PG, the septal and the peripheral PG, which would be responsible for the synthesis of the cross-wall and cell elongation, respectively. Recently, this view has been challenged and it is proposed that the ovoid shape of the pneumococcus relies on the continuous insertion of peripheral PG inside the septal PG rather than two successive phases of peripheral and septal synthesis (21). In addition, another study proposes that the three aPBPs (PBP1a, 1b, and 2a) of the pneumococcus would function autonomously to either repair the defects of the primary PG or make it denser and stronger (22). While the function of PBP1b remains elusive and is only proposed to participate in peripheral PG synthesis, PBP1a and PBP2a are crucial for the assembly of a mature cell wall (23). Although not essential, their co-deletion is synthetically lethal (23). To date, only three proteins have been shown to affect the function of class A PBPs in *S. pneumoniae*. The membrane protein CozEa (originally named CozE) (24), which regulates the localization of PBP1a, the homologous protein CozEb which also probably interferes with the function of PBP1a but indirectly (25) and MacP, which is reported to be an activator of PBP2a (26).

Recently, the membrane protein TseB (for tetracycline sensitivity suppressor of *ezrA*) (27) has also been proposed to interfere with the function of the bPBP PBP2A during cell elongation and spore germination in *Bacillus subtilis* (28). A homologous protein of unknown function Spr1400 is found in the pneumococcus but its function has never been investigated. In this report, we first show that the pneumococcus does not behave

like *B. subtilis* with respect to tetracycline sensitivity, ruling out a TseB-like effect for Spr1400. We also show that Spr1400 localizes to the division septum and is required for proper cell morphogenesis. We further demonstrate that Spr1400 interacts not only with the bPBP PBP2b, the counterpart of PBP2A in *B. subtilis*, but also with the aPBP PBP1a. Localization experiments further demonstrate that Spr1400 is required for the spatio-temporal dynamics of these two PBPs during the cell cycle. We thus named Spr1400 CopD for coordinator of PBP1a and 2b dynamics. These results thus identify the first protein that affects the function of both aPBPs and bPBPs. They also agree well with the current model of pneumococcal PG assembly and pave the way toward our further understanding of the coordination between the synthesis of primary peripheral PG with its remodeling and repair. More generally, they illustrate the complexity of the network of protein interactions required for PG assembly.

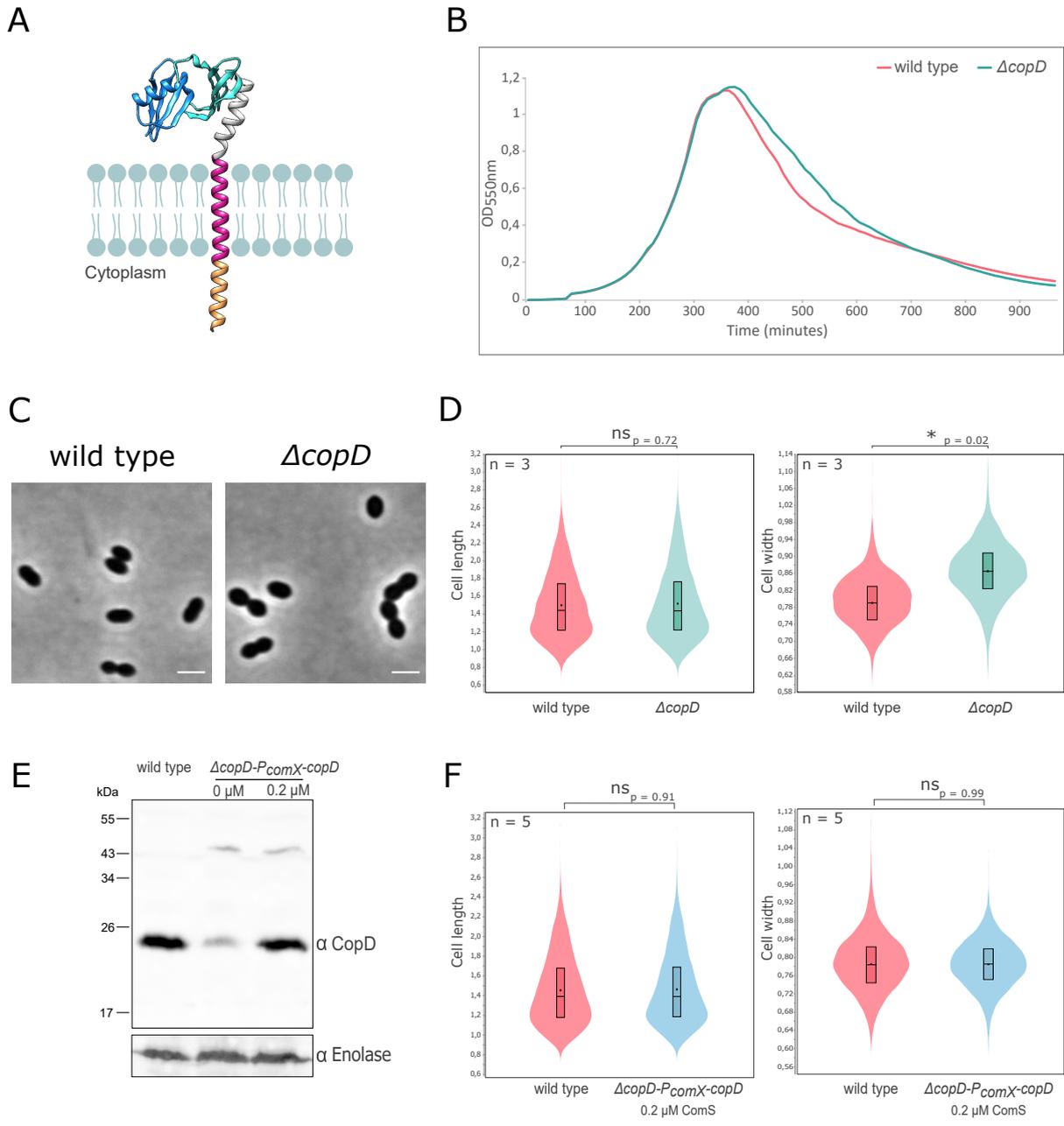
## RESULTS

### Depletion of EzrA does not impact tetracycline sensitivity of *S. pneumoniae*

CopD is a membrane protein homologous to TseB from *Bacillus subtilis* (24.26% sequence identity and 33.73% similarity) sharing the same organization with two PEPSY domains (28) in its extracellular domain (Fig. 1A). Deletion of *tseB* has been reported to suppress the hypersensitivity to tetracycline of an *ezrA*-deficient *B. subtilis* strain (27). To determine if the same was true for *S. pneumoniae*, we first determined a sublethal concentration of tetracycline for the WT strain. In the presence of 15 ng/mL tetracycline, an intermediate growth rate was detected, whereas in the presence of 1.5 ng/mL tetracycline or 150 ng/mL tetracycline, growth was almost unaffected or completely abolished, respectively (Fig. S1A). Since *ezrA* is essential in the pneumococcus (29, 30), we constructed an *ezrA*-depletion strain ( $\Delta ezrA$ -*P*<sub>comX</sub>-*ezrA*). *ezrA* expression increased with ComS concentration, with a similar amount of EzrA produced as WT cells with 2  $\mu$ M ComS (Fig. S1B). In this condition, this mutant strain grew like the WT strain, whereas it is unable to grow in the absence of ComS (Fig. S1C). Importantly, for this experiment, *ezrA* was under-expressed in presence of 1  $\mu$ M ComS and cells grew poorly (Fig. S1B and C). We, therefore, used 1  $\mu$ M ComS to analyze the effect of 1.5 and 15 ng/mL tetracycline on the growth of the  $\Delta ezrA$ -*P*<sub>comX</sub>-*ezrA* strain. As shown in Fig. S1D, the presence of tetracycline did not further alter the growth when *ezrA* was depleted. We also analyzed cell viability and found no differences (Fig. S1E). Taken together, these experiments showed that the depletion of *ezrA* did not affect tetracycline sensitivity. Therefore, *S. pneumoniae* does not behave like *B. subtilis* with respect to tetracycline sensitivity (27), making further investigation about the association between *copD* and *ezrA* irrelevant for this phenotype.

### CopD is required for cell morphogenesis and localizes at mid-cell

To investigate the role of CopD in the pneumococcus, we constructed a markerless deletion mutant.  $\Delta copD$  and WT showed similar growth profiles (Fig. 1B). Under the microscope, deletion of *copD* did not significantly affect the ovoid shape of pneumococcal cells (Fig. 1C). However, morphometric measurements of cells clearly showed that  $\Delta copD$  cells are significantly wider than WT cells, while the cell length was not affected (Fig. 1D). Indeed, the mean cell width for WT cells was  $0.79 \pm 0.03 \mu\text{m}$  whereas it was  $0.87 \pm 0.04 \mu\text{m}$  for  $\Delta copD$  cells. This observation was accompanied by a decrease in the population of cells with smaller width (4% of  $\Delta copD$  cells have a width below  $0.75 \mu\text{m}$  compared to 25% of WT cells) and an increase in the population of cells with larger width (74% of  $\Delta copD$  cells have a width above  $0.83 \mu\text{m}$  compared to 25% of WT cells). To exclude a downstream polar effect on the other genes of the same chromosomal locus, we constructed a complementation strain in which we introduced an ectopic copy of *copD* under the control of the inducible *comX* promoter in the  $\Delta copD$  strain ( $\Delta copD$ -*P*<sub>comX</sub>-*copD*). Using polyclonal antibodies specific to CopD, we observed that *copD* was expressed at a similar level than in WT cells after induction with 0.2  $\mu$ M ComS (Fig. 1E and F). Likewise, a WT phenotype was restored with a mean cell width of  $0.79 \mu\text{m}$



**FIG 1** CopD and cell morphology and growth. (A) Schematic model for CopD. The two PEPsy domains were modeled using AlphaFold (<https://alphafold.com/entry/Q8DP25>) and are adapted from published structural information of PEPsy-domains (PDB ID 5BO1). The predicted transmembrane domain and the short cytoplasmic domain (16 amino acids) are shown as red and orange  $\alpha$ -helices, respectively. The two PEPsy domains are shown in dark and light blue. (B) Growth of WT and  $\Delta copD$  strains. Strains were grown in C + Y medium at 37°C in a spectrophotometer. The OD<sub>550</sub> was read automatically every 10 minutes. (C) Representative phase contrast microscopy images of WT and  $\Delta copD$  cells. Scale bar, 2  $\mu$ m. (D) Violin plot showing the distribution of the cell length (left panel) and cell width (right panel) for WT and  $\Delta copD$  strains as determined using MicrobeJ (31). The distribution of the cell length and width are shown in red for the WT strain and in blue for the  $\Delta copD$  strain. Statistical comparison was done using *t*-test. \**P* < 0.05. *n* = 3 indicates the number of independent experiments with a total of 5,000 cells analyzed. (E) Western immunoblot of whole-cell lysates from WT and  $\Delta copD$ -*PcomX-copD* cells, grown to exponential phase in the presence (0.2  $\mu$ M) or absence of the ComS inducer, were probed with anti-CopD antibody. To estimate the relative quantity of proteins in crude extract and to compare the different lanes, we used the enolase (Spr1036) as an internal standard. The enolase was detected using specific antibodies ( $\alpha$  Enolase) and is presented in the lower part of the Figure. (F) Violin plot showing the distribution of the cell width for WT and  $\Delta copD$ -*PcomX-copD* strains as determined using MicrobeJ (31). The distribution of the cell length (left panel) and cell width (right panel) is shown in red for the WT strain and in blue for the  $\Delta copD$ -*PcomX-copD* strain. Statistical comparison was done using *t*-test. *n* = 5 indicates the number of independent experiments with a total of 10,000 cells analyzed. For panels D and F, the box indicates the 25th to the 75th percentile, and the whiskers indicate the minimum and the maximum values. The mean and the median are indicated with a dot and a line in the box, respectively.

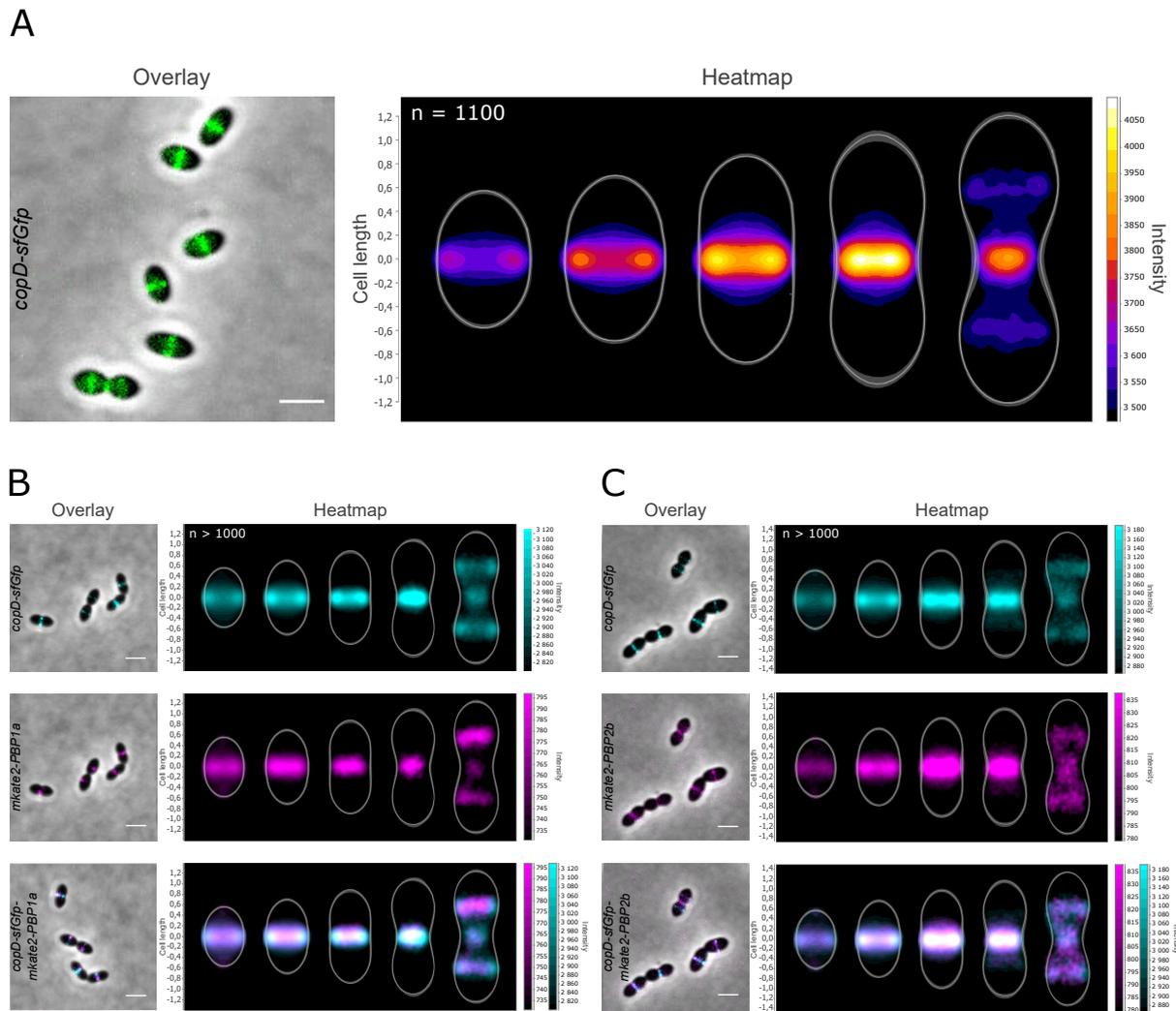
$\pm 0.02$  and the same distribution of cell width in the population of  $\Delta copD$  cells than in WT cells (21% of  $\Delta copD$  cells have a width below  $0.75 \mu\text{m}$  compared to 25% of WT cells and 21% of  $\Delta copD$  cells have a width above  $0.83 \mu\text{m}$  compared to 25% of WT cells) (Fig. 1F). These results suggest that CopD plays a role in cell morphogenesis.

To determine the localization of CopD, we constructed a C-terminal sfGFP fusion to CopD (strain *copD-sfGfp*). Throughout this study and unless otherwise indicated, protein fusions were constructed at each native chromosomal locus and expressed under the control of the native promoter, and represented the only source of protein. The CopD-sfGFP fusion was stable (Fig. S2A) and appeared to be fully functional as the cells grew as WT cells (Fig. S2B) and showed no significant change in cell width (Fig. S2C). As shown in Fig. 2A, CopD-sfGFP localized exclusively at the division septum. More precisely, the analysis of its dynamics in the course of the cell cycle showed that CopD-sfGFP is present at the division septum throughout the cell cycle. Interestingly, it re-localized to the cell equator, which corresponds to the future division site of the daughter cells, only at the very late stage of the cell cycle (Fig. 2A). Collectively, these data indicate that CopD is a cell division protein that is likely required for proper morphogenesis of the pneumococcus throughout the cell cycle.

### CopD interacts and co-localizes with PBP1a and PBP2b

To further investigate the potential function of CopD in cell division and morphogenesis, we hypothesized that it could affect the activity of PBPs. Supporting this hypothesis, the CopD homolog TseB of *B. subtilis* interacts with the class B PBP PBP2A (presumably equivalent to PBP2b in *S. pneumoniae*) (28). We first searched for physical interactions between CopD and aPBPs and bPBPs using a bacterial two-hybrid screen (32). Strikingly, we detected a reproducible interaction between CopD and only PBP1a and PBP2b (Fig. 3A). To confirm this observation, we determined whether these 2 PBPs are able to interact with CopD *in vivo* by co-immunoprecipitation experiments. After CopD-sfGFP capture, PBP1a and PBP2b antibodies revealed an interaction between CopD and PBP1a and PBP2b (Fig. 3B). We then sought to better characterize how CopD interacts with PBP1a and PBP2b. We overproduced the extracellular two-PEPSY domain of CopD (from Met38 to Leu162, CopD<sub>ED</sub>) and the two transpeptidase domains of PBP1a (from Ser266 to Asn650, PBP1a<sub>TP</sub>) and PBP2b (from Met39 to Asn685, PBP2b<sub>TP</sub>), performed Ni-NTA affinity purification (Fig. S3) and used Microscale Thermophoresis. Surprisingly, no binding of CopD to either PBP1a<sub>TP</sub> or PBP2b<sub>TP</sub> was detected ( $KD > 10 \mu\text{M}$ ) (Fig. 3C). This observation suggested that the interaction between CopD and the 2 PBPs was mediated by their transmembrane domain (TM) and/or their short cytoplasmic domain (CD) (16, 12, and 12 amino acids in CopD, PBP1a, and PBP2b, respectively) (Fig. 1A). To test this hypothesis, we constructed variants replacing TM and CD of PBP1a or PBP2b with TM and CD of two other PBPs, PBP2a, or PBP2x, respectively, which did not interact with CopD (Fig. 3A). Bacterial two-hybrid assays showed that both of the PBP1a/PBP2a<sub>TM-CD</sub> and PBP2b/PBP2x<sub>TM-CD</sub> variants lost their ability to interact with CopD (Fig. 3A). As a control, the other two variants PBP2a/PBP1a<sub>TM-CD</sub> and PBP2x/PBP2b<sub>TM-CD</sub> were able to interact with CopD, although the signal was weaker than with wild-type PBP1a and PBP2b. These data thus demonstrate that the interaction between CopD and PBP1a and PBP2b is independent of their extracellular domains.

We then analyzed the localization of the three proteins to determine when CopD co-localizes with PBP1a and PBP2b during the cell cycle. We first constructed strains expressing *mkate2-PBP1a* and *mkate2-PBP2b*. The latter is expressed under the control of the native promoter at its chromosomal locus and the analysis of cell growth and cell shape confirmed that this fusion is functional, as already shown when fused to another fluorescent tag (33) (Fig. S4A and B). On the other hand, since fusions to PBP1a are not fully functional (25), we constructed a merodiploid strain carrying an ectopic *mkate2-PBP1a* fusion under the control of the zinc-inducible  $P_{Zn}$  promoter at the non-essential *bga* locus. We also confirmed that the cells grew and were shaped like WT cells (Fig. S5A and B). For both strains, we verified that *mkate2-PBP1a* and *mkate2-PBP2b* were stable

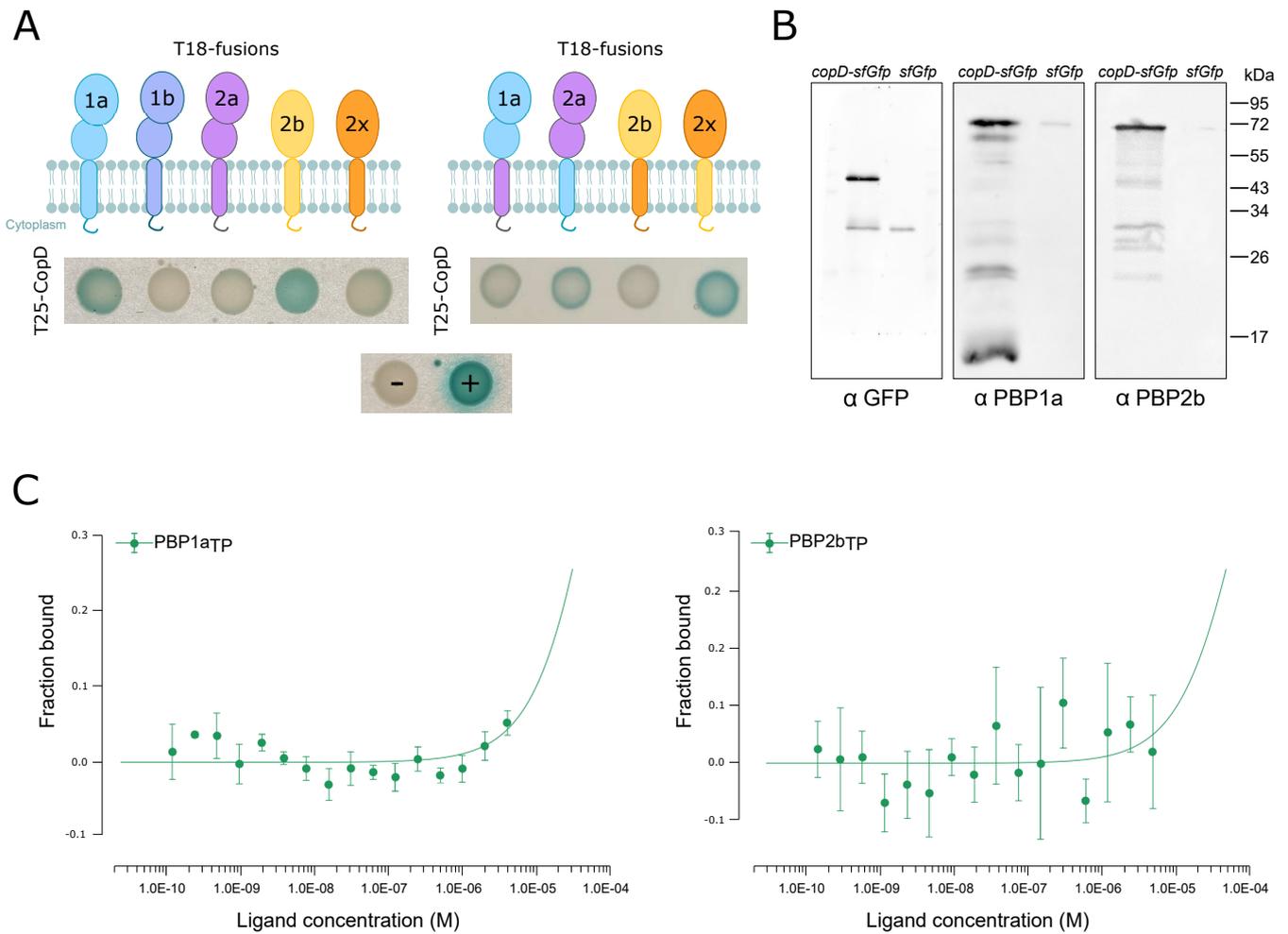


**FIG 2** Localization of CopD-sfGFP, mKate2-PBP1a, and mKate2-PBP2b. (A) Overlays (left panel) between phase-contrast and GFP images of CopD-sfGFP cells. Scale bar, 2  $\mu$ m. The heatmap (right panel) represents the localization patterns of CopD-sfGFP during the cell cycle. (B) and (C) co-localization of CopD-sfGFP and either mKate2-PBP1a (B) or mKate2-PBP2b (C) in WT cells. Overlays between phase contrast and GFP and mKate2 images are shown on the left while corresponding heatmaps representing the two-dimensional localization patterns during the cell cycle are shown on the right. Scale bar, 2  $\mu$ m. The  $n$  values represent the number of cells analyzed in a single representative experiment. Experiments were performed in triplicate.

and properly localized at midcell (Fig. S4C and D, S5C and D). The two strains were then transformed with *copD-sfGFP*, resulting in double-labeled strains expressing either both CopD-sfGFP and mKate2-PBP1a (*copD-sfGfp-P<sub>Zn</sub>mKate2-PBP1a*) or CopD-sfGFP and mKate2-PBP2b (*copD-sfGfp-mKate2-PBP2b*). As expected, the three proteins localized to the division septum and the cell equators (Fig. 2B and C). More importantly, heatmaps showed that the three proteins shared the same dynamics and co-localized throughout the cell cycle. Taken together, these observations show that CopD is able to interact with PBP1a and PBP2b, and further suggest that it could influence the function of these two PBPs at each stage of the cell cycle.

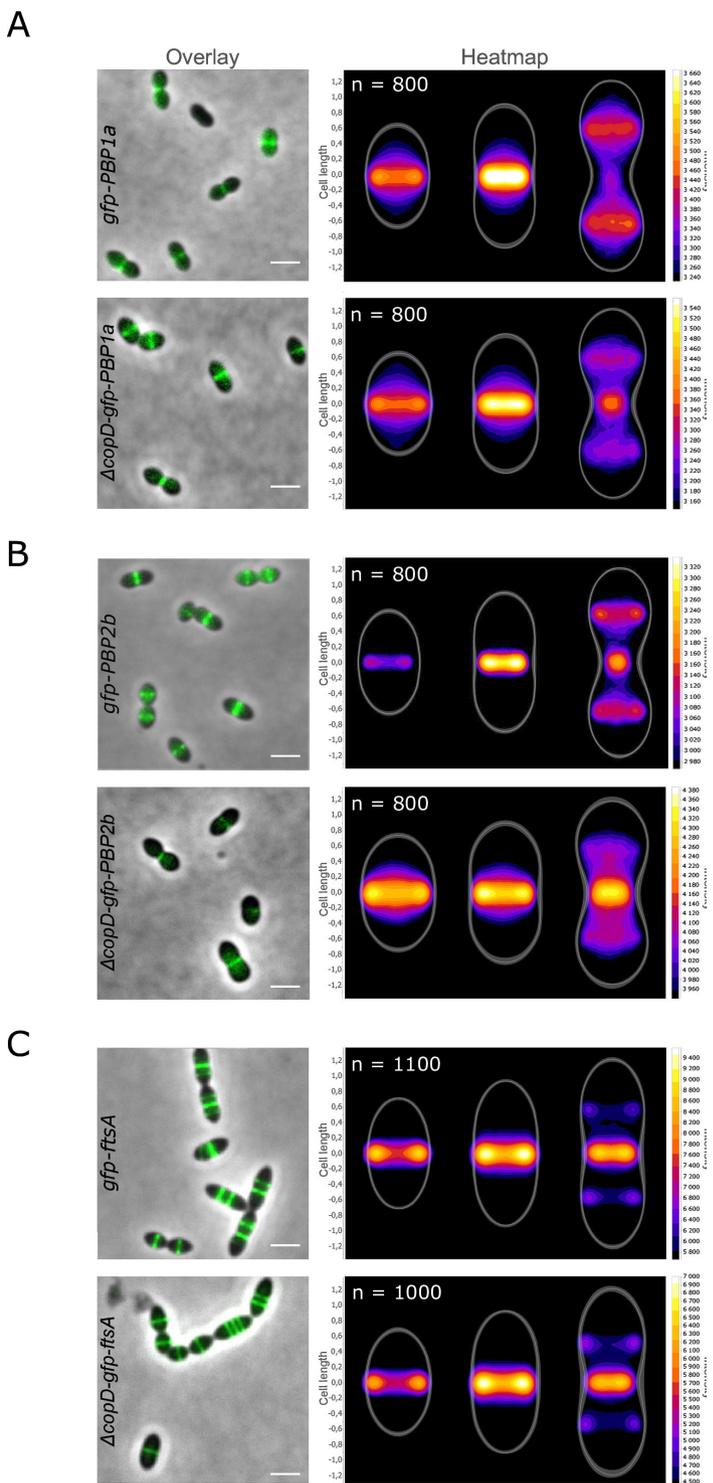
### Deletion of *copD* alters PBP1a and PBP2b dynamics

Since there was no interaction occurring between the extracellular domains of the three proteins, we reasoned that the mode of interaction between CopD and PBP1a or PBP2b, which requires their transmembrane and cytoplasmic domains, could modulate the localization and/or the dynamics of PBP1a and PBP2b rather than their activity. We,



**FIG 3** Analysis of the interaction between CopD, PBP1a and PBP2b. (A) Bacterial two-hybrid analyses. Plasmids, expressing the T25 fragment of the adenylate cyclase protein fused to the N-terminus of CopD or the T18 fragment fused to the N-terminus of PBP1a, PBP2b, and derivatives, were constructed and the interactions between CopD and either PBP1a or PBP2b or derivatives were assessed after co-transformation of T18- and T25-constructs in *E. coli* BTH101. The blue coloration indicates positive interactions. (B) Immunoprecipitation of PBP1a and PBP2b with CopD-sfGFP in *copD-sfGfp* and *P<sub>comX</sub>-sfGfp* strains using anti-GFP antibodies. Samples were analyzed by immunoblotting using either anti-GFP (left panel) to check that the specificity of the anti-GFP immunoprecipitation, or anti-PBP1a antibodies (middle panel) or anti-PBP2b antibodies (right panel) to determine the presence of co-immunoprecipitated mkate2-PBP1a or mkate2-PBP2b, respectively. The data shown are representatives of experiments made independently in triplicate. (C) Affinity measurements by Microscale Thermophoresis of labeled CopD-6His binding to increasing concentrations of either PBP1a<sub>TP</sub>-6his (left panel) or PBP2b<sub>TP</sub>-6His (right panel). The fraction bound FNorm (normalized fluorescence = fluorescence after thermophoresis/initial fluorescence) is plotted as a function of ligand concentration. Measures are represented by green dots and the fitted curve by green lines. The K<sub>D</sub> is not measurable and >10<sup>-5</sup> M. Experiments were made independently in triplicate.

therefore, deleted *copD* in strains expressing *gfp-PBP1a* and *gfp-PBP2b*. The resulting strains,  $\Delta copD$ -P<sub>Zn</sub>*gfp-PBP1a* and  $\Delta copD$ -*gfp-PBP2b*, were then analyzed by microscopy. In both strains, the ability of GFP-PBP1a and GFP-PBP2b to position at mid-cell was not affected (Fig. 4A and B), indicating that CopD is not required for their localization at the division septum. Importantly, however, heatmap analysis revealed that the dynamics of both PBPs were affected. Indeed, the fluorescence signals of PBP1a and PBP2b are brighter at the division site of  $\Delta copD$  cells at a later stage of the cell cycle than in WT cells. Simultaneously, their fluorescent signal at the daughter cell equator is less intense. As a control, and to check whether the overall divisome dynamics is also affected, we localized GFP-FtsA as a proxy for the divisome in  $\Delta copD$  cells (Fig. 4C). No difference was detected between WT and  $\Delta copD$  cells confirming that CopD governs the timing of localization of PBP1a and PBP2b at the division and equatorial sites.



**FIG 4** Localization of GFP-PBP1a, GFP-PBP2b, and GFP-FtsA in WT and  $\Delta copD$  cells. (A) GFP-PBP1a, (B) GFP-PBP2b, and (C) GFP-FtsA. Overlays between phase-contrast and GFP images in WT and  $\Delta copD$  cells are shown. Scale bar, 2  $\mu m$ . Corresponding heatmaps representing the two-dimensional localization patterns during the cell cycle are shown on the right of overlays. The  $n$  values represent the number of cells analyzed in a single representative experiment. Experiments were performed in triplicate.

## DISCUSSION

In this study, we show that CopD is a morphogenic protein that controls the dynamics of PBP1a and PBP2b. This control is mediated by a direct interaction between the transmembrane helices and the short cytoplasmic domains of CopD, PBP1a, and PBP2b. However, we did not detect any interaction between the extracellular domain of CopD and the TP domains of PBP1a and PBP2b. The extracellular domain of CopD is composed of 2 PEPSY domains between S47 and Q100 and Q109-E160 according to AlphaFold prediction (Fig. 1A and <https://alphafold.com/entry/Q8DP25>). Therefore, it would be interesting to evaluate the function of the CopD PEPSY domains. PEPSY domains consist of four antiparallel  $\beta$ -strands and one helix, a fold that belongs to the bacterial superfamily of BLIP ( $\beta$ -lactamase inhibitor protein) like protein (BLIP-like proteins) (34). This family encompasses four families (DUF2874, BLIP, SmpA\_OmlA, and PEPSY) of proteins with no or diverse additional domains (34). The function and thus the mode of action of these proteins is still poorly understood, but a number of them are involved in maintaining the integrity of the bacterial cell envelope (35–37).

PEPSY domains were initially described as intramolecular inhibitor of protease activity in the M4 family of metallopeptidases (38). However, further analyses have shown that they are present in other transmembrane proteins with different functions. For example, the three tandem PEPSY domains of YpeB are critical for the stability, localization, and activity of the lytic transglycosidase SleB required for *Bacillus anthracis* spore germination (39). Similar to the interaction between CopD and PBP1a and 2b, the PEPSY domains of YpeB don't seem to be involved in the interaction with SleB (39, 40). Two studies report that PEPSY domain proteins participate in bacterial cell development and morphogenesis. The secreted protein SspA from *Streptomyces coelicolor* has two PEPSY domains that are required for proper spore morphology and septation (41). However, the underlying mechanism is unknown and it is only hypothesized that SspA may affect the function of some peptidoglycan hydrolases and/or PBPs. The other example is the CopD homologous protein TseB from *B. subtilis* (28). This protein was originally shown to suppress the tetracycline sensitivity of an *ezrA* mutant in *B. subtilis* (27). This property is not relevant in the pneumococcus because depletion of *ezrA* (*ezrA* is essential in *S. pneumoniae*) does not confer tetracycline sensitivity (Fig. S1). In contrast and importantly, TseB directly interacts with PBP2A, the homolog of pneumococcal PBP2b (28). In addition, *B. subtilis* cells lacking *tseB* are also wider, an observation also made with the pneumococcal  $\Delta copD$  mutant (Fig. 1C and D). Thus, it seems that the two homologs TseB and CopD have a similar function in bacterial cell morphogenesis. Nevertheless, some properties of the two proteins differ. TseB interacts with PBP2A through its PEPSY and TP domains, respectively, according to pull-down experiments. Although this finding fits well with the inhibitory and/or stabilizing role originally proposed for PEPSY domains (39, 42), TseB is, however, not required for PBP2A activity and stability (28). The situation is different in the pneumococcus, where CopD and PBP1a and PBP2b interact through their transmembrane and cytoplasmic domains (Fig. 3). This discrepancy may reflect a real difference in the mode of action of CopD and TseB. This hypothesis is supported by the observation that TseB was not found to control the function of any aPBP in *B. subtilis* (28). In addition, CopD modulates the dynamics of PBP1a and PBP2b (Fig. 4A and B), whereas the effect of TseB on the dynamics of PBP2A remains to be evaluated.

Importantly, deletion of *PBP2A* has no detectable effect on *B. subtilis* cell shape (43), whereas deletion of *PBP1a* or depletion of *PBP2b* generates pneumococcal cells with either reduced cell size or a lentil-like shape (44, 45). Therefore, it can be suggested that TseB may regulate proteins other than PBP2A to control cell morphogenesis. Supporting this, a recent AI-assisted structural proteomics study suggests that TseB may interact with the elongasome protein MreC (46). Furthermore, the interaction between TseB and PBP2A is required for spore germination (28). Collectively, TseB would function in a different way than CopD and could also be considered as a functional homolog of SppA from *S. coelicolor* (41). This raises the question of the role of the PEPSY domains of CopD. To what extent do they contribute to the regulatory function of CopD?

Are they necessary (or even detrimental) for the interaction with other partners to coordinate PBP1a and PBP2b with the divisome activity? Do they regulate the activity of other partners, and for example, some lytic enzymes required to coordinate PG primary synthesis and maturation (39)? Future work is definitely needed to address these questions.

A striking observation of this study is the presence of wider cells in absence of CopD (Fig. 1C and D). In contrast to cell elongation, how bacteria define their width is much less understood. A recent study in *B. subtilis* shows that the Rod complex moves circumferentially and produces oriented PG materials (47). This dynamic makes the sacculi more rigid and able to maintain the cell width, thus preventing cell widening. On the other hand, aPBPs do not move circumferentially and insert PG material isotropically, resulting in sacculi widening. Thus, the balance between PG assembly by the Rod system and aPBPs is critical in controlling cell width. The observed widening of cells in the absence of CopD is thus consistent with this model as CopD influences the dynamics of PBP2b, which work with RodA in the pneumococcal Rod system (48), and PBP1a, which is also part of the pneumococcal elongasome (45).

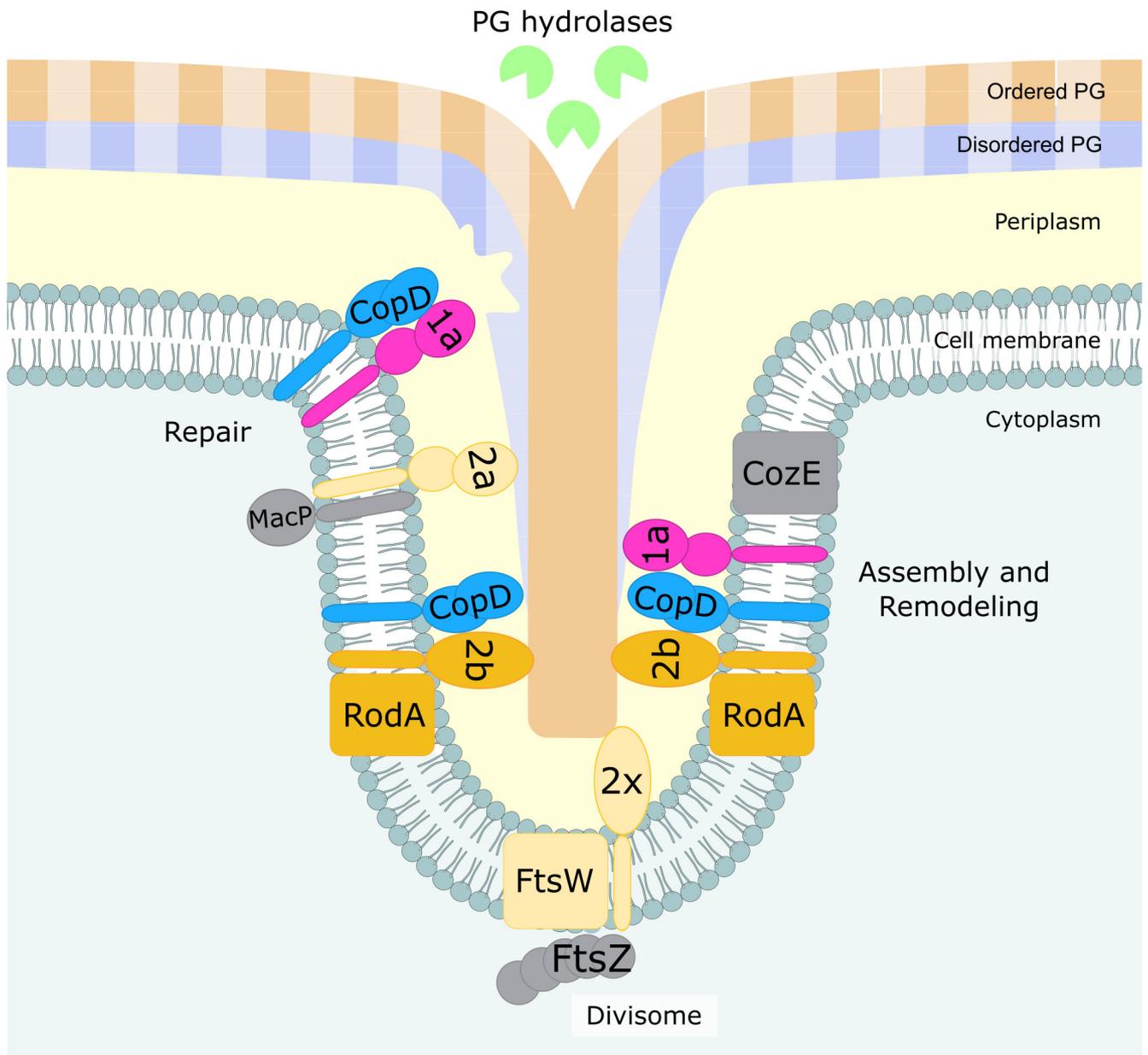
The larger cell width of  $\Delta copD$  cells also fits well with the new model of pneumococcal PG assembly dynamics. Indeed, cell elongation would rely on the production of a composite PG due to the coordinated insertion of peripheral PG into the septal PG, which is continuously cleaved by hydrolases (21) (Fig. 5). The persistence of PBP1a and 2b at the division septum and the delay in their positioning at the equator (the division septum of the daughter cell) (Fig. 4AB) likely imbalance the production of peripheral PG with respect to the septal one and thus affect the composite nature of the PG resulting in cell widening. Finally, it has been demonstrated that aPBPs can function autonomously outside of the areas of active PG synthesis to repair the defects and/or damage of the primary PG (Fig. 5) (22). Therefore, CopD could be considered as a regulator that affects the function of PBP1a and PBP2b to coordinate both primary cell wall assembly and repair. This hypothesis is also consistent with the observations made by Pasquina-Lemonche and co-workers, who showed that two different PG layers with different architecture (concentric or randomly oriented) would be produced at the septum (49). Adapted to the pneumococcus, CopD could also contribute to coordinate random PG synthesis with the repair of the PG layer by controlling the spatiotemporal localization of PBP1a at the septum. On the other hand, CopD would also govern the assembly of the septal/peripheral composite PG required for cell elongation (50) (Fig. 5).

Last and most importantly, the pneumococcus encodes for several PBP regulators: CozE (also called CozEa), CozEb, MacP, and now CopD (24–26). While CozEa and indirectly CozEb control PBP1a, MacP targets PBP2a. Considering that, deletion of *PBP1a* reduces cell size while deletion of *PBP2a* does not (45), and that deletion of *PBP1a* and *PBP2a* is synthetically lethal (23), these two PBPs are functionally redundant but also have specific functions in PG assembly. In addition, the localization of the second pneumococcal bPBP, PBP2x, is dependent on the serine/threonine-kinase StkP (51). An indirect relationship also links PBP2b to the elongation regulator EloR/Jag/KphB since its absence suppresses the essentiality of PBP2b (52–54). As complicated as it may be, further work aiming at deciphering the interplay between all these regulators promises to further characterize the specific function of aPBPs and bPBPs in the assembly and maturation of the PG layer.

## MATERIALS AND METHODS

### Strains and growth conditions

*S. pneumoniae* strains were grown in C + Y or THY medium at 37°C. Cell growth was monitored automatically in JASCO V-630-BIO-spectrophotometer by optical density (OD) readings every 10 minutes at 550 nm. For growth on plate, THY agar supplemented with 3% sheep blood was used. *S. pneumoniae* mutants were obtained by transformation as previously described using the synthetic competence stimulating peptide 1 (CSP1) (55). Strains expressing genes under the control of the pComX or P<sub>Zn</sub> promoter were cultured



**FIG 5** Model for CopD role in *S. pneumoniae* cell morphogenesis. CopD (light blue) modulates the dynamics of the class A PBP1a (pink) and the class B PBP2b (orange), which are both required for peripheral PG synthesis (faded salmon and blue strips). CopD could thus allow to coordinate the assembly of the primary peripheral PG with its remodeling by the RodA/PBP2b system (orange and blue) and PBP1a (pink) and hydrolases (green), respectively. This coordination is critical in controlling cell width (47). CopD could also contribute to organize the two layers PG architecture made of randomly oriented strands (blue and faded blue) facing the cytoplasm and ordered concentric rings strands (salmon and faded salmon) (49). According to the recent model of PG assembly and remodeling (21), CopD could also influence the balance of the insertion of peripheral (faded salmon and blue strips) into septal (salmon and blue strips) PG to generate a native peripheral PG mesh. Because aPBPs can function as autonomous entities, CopD could be important for PG repair and maintenance (22). Lastly, it remains to be determined if CopD cross-talks with other regulators of aPBPs like CozE and MacP (gray). The visual of this drawing was inspired by reference 50.

at 37°C in presence of either the inducer peptide ComS (56) or Zn 100 μM, respectively. The *E. coli* XL1-Blue strain was used for cloning, *E. coli* BL21(DE3) and BL21 star (DE3) strains for protein overexpression, and *E. coli* BTH101 strain for bacterial two hybrid experiments. Strains and plasmids used in this study are listed in Table S1 and S2, and were verified by DNA sequencing.

## Allelic replacement mutagenesis and plasmid construction

To construct *S. pneumoniae* mutants (gene deletions, ectopic gene expression GFP/mKate2 fusions), we used a two-step procedure, based on a bicistronic *kan-rpsL* cassette called Janus (57), which allows a physiological level of expression of gene derivatives at their chromosomal locus. DNA fragments encoding the extracellular domains of CopD, PBP1a, and PBP2b were obtained by PCR using chromosomal DNA from *S. pneumoniae* R800 strain as template. Full description of primers used for the construction of strains and plasmids is provided in Table S2.

## Tetracycline hypersensitivity experiments

To test tetracycline hypersensitivity, wild-type and *pComX-ezrA*, *ΔezrA* strains were grown in C + Y until they reached  $OD_{550} = 0.1$ . Cell cultures were then diluted and plated on raising concentrations of tetracycline (0, 1.5, and 15 ng/mL) in presence or absence of ComS. Plates were incubated 15 hours at 37°C and CFU were counted. The relative proportion of viable CFU (CFU with tetracycline/CFU without tetracycline × 100) was then calculated.

## Microscopy techniques and image analysis

For microscopy experiments, 1 μL of exponentially growing cells was spotted onto an 1% agarose C + Y pad on a microscopy slide and covered with a coverglass. Slides were visualized with a Nikon Ti-E/B microscope fitted with an Orca-CMOS Flash4 V2 camera with a 100 Å ~ 1.45 objective. Images were collected using NIS-Elements (Nikon). Images were collected using NIS-Elements (Nikon) and were analyzed with ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and the MicrobeJ plugin (31). For statistical analysis, Student's t-tests were performed in triplicate using the MicrobeJ.

## Bacterial two hybrid

The BACTH (Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid) system kit was used according to the manufacturer's protocol (Euromedex) (32). Co-transformants were re-streaked on an LB agar plate supplemented with ampicillin 0.1 mg/mL, kanamycin 0.05 mg/mL, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 0.5 mM, and X-gal 100 μg/mL. Plates were grown at room temperature and photos were taken at 24, 40, 65, and 72 hours to monitor the appearance of blue colonies. Plasmids used in this experiment are listed in Table S2.

## Co-immunoprecipitation

Cultures of *copD-sfGFP* and *PcomX-sfGFP* cells were grown at 37°C in THY medium until they reached  $OD_{550nm} = 0.4$ . After centrifugation, cell pellets were then incubated at 30°C for 30 minutes in buffer A (0.1 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1M sucrose, 1:100 Protease Inhibitory Cocktail, 1 mg/mL of DNase I and RNase A), centrifuged again and then incubated in buffer B (0.1 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% [vol/vol] Triton X-100, 1:100 Protease Inhibitory Cocktail, 1 mg/mL of DNase I and RNase A) at room temperature for 15 minutes. After centrifugation, the supernatant was incubated with the GFP-TRAP resin suspension according to the manufacturer's instructions (Chromotech). Protein-bound GFP-TRAP resin was eluted with Laemmli buffer at 95°C for 10 minutes and analyzed by SDS-PAGE and Western blot with either anti-GFP antibodies, or anti-PBP1a or anti-PBP2a antibodies.

## Preparation of *S. pneumoniae* crude extracts and immunoblot analysis

Cultures of *S. pneumoniae* were grown in C + Y, pelleted and resuspended in Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM. After cell disruption by sonication, crude extracts were analyzed by SDS-PAGE and electrotransferred onto an immobilon-P membrane (Millipore). Primary antibodies were used at 1:5,000 (anti-GFP, Amsbio), 1:20,000

(anti-PBP1a [58]), 1:20,000 (anti-PBP2b [58]), 1:10,000 (anti-Spr1400-Extra, Covalab) in TBST-BSA 1% and 1:250,000 (anti-Enolase [(59)] in TBST-BSA 5%. The goat anti-rabbit secondary antibody HRP conjugate (Biorad) was used at 1: 5,000.

## Protein purification

Recombinant plasmids overproducing CopD<sub>ED</sub> and PBP2b<sub>TP</sub> were transformed into the BL21(DE3) *E. coli* strain, whereas plasmids overproducing PBP1a<sub>TP</sub> were transformed into the BL21 star (DE3) *E. coli* strain. The strains were grown in Luria Bertani (LB) broth at 37°C until they reached OD<sub>600nm</sub> = 0.5 and then induced with 0.5 mM (IPTG) for 3 hours at 37°C. Bacterial pellets were then resuspended in buffer A (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 200 mM, glycerol 10%, DTT 1 mM) supplemented with 10 mM imidazole, 1 µg/mL lysozyme, 6 µg/mL DNase/RNase and 1× protein inhibitor Roche. After sonication and centrifugation 30 minutes at 30,000 × *g*, soluble proteins were incubated with a Ni-NTA agarose resin (Qiagen) for 30 minutes, washed with buffer A supplemented with 20 mM imidazole, and then eluted in buffer A supplemented with 150 mM imidazole (300 mM for PBP1a<sub>TP</sub>).

PBP2b<sub>TP</sub> was then digested in dialysis buffer (HEPES 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, glycerol 10%) overnight in presence of TEV in a 1:40 (wt:wt) ratio. The dialyzed sample was then gel filtrated using a S75 10/300 Increase column (Cytiva) and buffer B (HEPES 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, glycerol 10%). CopD<sub>EC</sub> was dialyzed in buffer B without any TEV cleavage. Extra steps were needed to purify the TP domain of PBP1a. The extracellular domain of PBP1a was digested by trypsin (ratio 1:200[wt/wt]) in Tris-HCl 25 mM pH 8 for 30 minutes at 37°C to isolate the TP domain, as previously described (60). The TP domain was then purified by gel filtration as for PBP2b<sub>TP</sub>.

## Thermophoresis experiments

The Monolith NT.115 instrument was used to perform thermophoresis experiments. CopD<sub>ED</sub> was labeled using the Protein labeling kit red NHS 2nd generation (Nanotemper) according to manufacturer's instructions. For every experiment, the following settings were used: MST power = 40%; NanoRed laser, excitation power = 40%. All measurements were carried out in 20 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% Tween 20 detergent using standard capillaries. 6-his labeled CopD<sub>ED</sub> was tested at the concentration at 168 nM with ranging concentration of PBP2b<sub>TP</sub> and PBP1a<sub>TP</sub> of 5.2 µM to 0.159 nM and 4.5 µM to 0.137 nM, respectively. Experiments were performed at 25°C.

## ACKNOWLEDGMENTS

C.L. is supported by a FRM grant (ECO202006011593). C.G. and A.G. are supported by the ANR (19-CE15-0011-01), the CNRS, the Université de Lyon, and the Bettencourt-Schueller foundation.

We thank Céline Freton for expert technical assistance.

## AUTHOR AFFILIATIONS

<sup>1</sup>Molecular Microbiology and Structural Biochemistry, UMR, Université de Lyon, CNRS, Lyon, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Chimie Bactérienne, UMR, Aix-Marseille Université, CNRS, Marseille, France

<sup>3</sup>Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, UMR, Aix-Marseille Université, Marseille, France

## AUTHOR ORCIDs

Christophe Grangeasse  <http://orcid.org/0000-0002-5484-4589>

## FUNDING

Funder	Grant(s)	Author(s)
Agence Nationale de la Recherche (ANR)	19-CE15-0011-01	Christophe Grangeasse
Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)	ECO202006011593	Cassandra Lenoir
Agence Nationale de la Recherche (ANR)	19-CE15-0011-01	Anne Galinier

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Cassandra Lenoir, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – review and editing | Anaïs Pelletier, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology | Sylvie Manuse, Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing – review and editing | Hugo Millat, Formal analysis, Investigation | Adrien Ducret, Formal analysis, Supervision | Anne Galinier, Writing – review and editing | Thierry Doan, Conceptualization, Writing – review and editing | Christophe Grangeasse, Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review and editing

## ADDITIONAL FILES

The following material is available [online](#).

## Supplemental Material

**Supplemental Material (mBio01411-23-S0001.pdf)**. Figures S1 to S5 and Tables S1 and S2.

## REFERENCES

- Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Egan AJF, Errington J, Vollmer W. 2020. Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nat Rev Microbiol* 18:446–460. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0366-3>
- Rohs PDA, Bernhardt TG. 2021. Growth and division of the peptidoglycan matrix. *Annu Rev Microbiol* 75:315–336. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120056>
- Kumar S, Mollo A, Kahne D, Ruiz N. 2022. The bacterial cell wall: from lipid II flipping to polymerization. *Chem Rev* 122:8884–8910. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00773>
- Sham L-T, Butler EK, Lebar MD, Kahne D, Bernhardt TG, Ruiz N. 2014. Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science* 345:220–222. <https://doi.org/10.1126/science.1254522>
- Meeske AJ, Riley EP, Robins WP, Uehara T, Mekalanos JJ, Kahne D, Walker S, Kruse AC, Bernhardt TG, Rudner DZ. 2016. SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature* 537:634–638. <https://doi.org/10.1038/nature19331>
- Young KD. 2007. Bacterial morphology: why have different shapes? *Curr Opin Microbiol* 10:596–600. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.009>
- Randich AM, Brun YV. 2015. Molecular mechanisms for the evolution of bacterial morphologies and growth modes. *Front Microbiol* 6:580. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00580>
- Williams MA, Aliashkevich A, Krol E, Kuru E, Bouchier JM, Rittichier J, Brun YV, VanNieuwenhze MS, Becker A, Cava F, Brown PJB, Sloan Siegrist M. 2021. Unipolar peptidoglycan synthesis in the rhizobiales requires an essential class A penicillin-binding protein. *mBio* 12:e0234621. <https://doi.org/10.1128/mBio.02346-21>
- Taguchi A, Welsh MA, Marmont LS, Lee W, Sjodt M, Kruse AC, Kahne D, Bernhardt TG, 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>
- Sjodt M, Rohs PDA, Gilman MSA, Erlandson SC, Zheng S, Green AG, Brock KP, Taguchi A, Kahne D, Walker S, Marks DS, Rudner DZ, Bernhardt TG, Kruse AC. 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>
- Rismondo J, Halbedel S, Gründling A. 2019. Cell shape and antibiotic resistance are maintained by the activity of multiple FtsW and RodA enzymes in *Listeria monocytogenes*. *mBio* 10:e01448-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01448-19>
- Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32:234–258. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
- Reichmann NT, Tavares AC, Saraiva BM, Jouselin A, Reed P, Pereira AR, Monteiro JM, Sobral RG, VanNieuwenhze MS, Fernandes F, Pinho MG. 2019. EDS-bPBP pairs direct lateral and septal peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Nat Microbiol* 4:1368–1377. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0437-2>
- Pazos M, Vollmer W. 2021. Regulation and function of class A penicillin-binding proteins. *Curr Opin Microbiol* 60:80–87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.01.008>
- Gou X, Zhang Q, More S, Bamunuarachchi G, Liang Y, Haider Khan F, Maranville R, Zuniga E, Wang C, Liu L. 2019. Repeated exposure to *Streptococcus pneumoniae* exacerbates chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Pathol* 189:1711–1720. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.05.012>
- Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. 2018. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol* 16:355–367. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0001-8>
- Grangeasse C. 2016. Rewiring the pneumococcal cell cycle with serine/threonine- and tyrosine-kinases. *Trends Microbiol* 24:713–724. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.04.004>

19. Vollmer W, Massidda O, Tomasz A. 2019. The cell wall of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol Spectr* 7. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0018-2018>
20. Briggs NS, Bruce KE, Naskar S, Winkler ME, Roper DI. 2021. The pneumococcal divisome: dynamic control of *Streptococcus pneumoniae* cell division. *Front Microbiol* 12:737396. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737396>
21. Trouve J, Zapun A, Arthaud C, Durmort C, Di Guilmi AM, Söderström B, Pelletier A, Grangeasse C, Bourgeois D, Wong Y-S, Morlot C. 2021. Nanoscale dynamics of peptidoglycan assembly during the cell cycle of *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Biol* 31:2844–2856. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.041>
22. Straume D, Piechowiak KW, Olsen S, Stamsås GA, Berg KH, Kjos M, Heggenhougen MV, Alcorlo M, Hermoso JA, Håvarstein LS. 2020. Class A PBPs have a distinct and unique role in the construction of the pneumococcal cell wall. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:6129–6138. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917820117>
23. Paik J, Kern I, Lurz R, Hakenbeck R. 1999. Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins. *J Bacteriol* 181:3852–3856. <https://doi.org/10.1128/JB.181.12.3852-3856.1999>
24. Fenton AK, El Mortaji L, Lau DTC, Rudner DZ, Bernhardt TG. 2016. CozE is a member of the MreCD complex that directs cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Microbiol* 2:16237. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.237>
25. Stamsås GA, Restelli M, Ducret A, Fretton C, Garcia PS, Håvarstein LS, Straume D, Grangeasse C, Kjos M. 2020. A CozE homolog contributes to cell size homeostasis of *Streptococcus pneumoniae*. *mBio* 11:e02461-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02461-20>
26. Fenton AK, Manuse S, Flores-Kim J, Garcia PS, Mercy C, Grangeasse C, Bernhardt TG, Rudner DZ. 2018. Phosphorylation-dependent activation of the cell wall synthase PBP2a in *Streptococcus pneumoniae* by MacP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:2812–2817. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715218115>
27. Gamba P, Rietkötter E, Daniel RA, Hamoen LW. 2015. Tetracycline hypersensitivity of an *ezaA* mutant links GalE and TseB (YpmB) to cell division. *Front Microbiol* 6:346. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00346>
28. Delisle J, Cordier B, Audebert S, Pophillat M, Cluzel C, Espinosa L, Grangeasse C, Galinier A, Doan T. 2021. Characterization of TseB: a new actor in cell wall elongation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 116:1099–1112. <https://doi.org/10.1111/mmi.14798>
29. Perez AJ, Villicana JB, Tsui H-CT, Danforth ML, Benedet M, Massidda O, Winkler ME. 2021. FtsZ-ring regulation and cell division are mediated by essential *EzrA* and accessory proteins *ZapA* and *ZapJ* in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Microbiol* 12:780864. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.780864>
30. Thanassi JA, Hartman-Neumann SL, Dougherty TJ, Dougherty BA, Pucci MJ. 2002. Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 30:3152–3162. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf418>
31. Ducret A, Quardokus EM, Brun YV. 2016. MicrobeJ, a tool for high throughput bacterial cell detection and quantitative analysis. *Nat Microbiol* 1:16077. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.77>
32. Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D. 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5752–5756. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5752>
33. Fleurie A, Manuse S, Zhao C, Campo N, Cluzel C, Lavergne J-P, Fretton C, Combet C, Guiral S, Soufi B, Macek B, Kuru E, VanNieuwenhze MS, Brun YV, Di Guilmi A-M, Claverys J-P, Galinier A, Grangeasse C. 2014. Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. *PLoS Genet* 10:e1004275. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004275>
34. Das D, Finn RD, Carlton D, Miller MD, Abdubek P, Astakhova T, Axelrod HL, Bakolitsa C, Chen C, Chiu HJ, Chiu M, Clayton T, Deller MC, Duan L, Ellrott K, Ernst D, Farr CL, Feuerhelm J, Grant JC, Grzechnik A, Han GW, Jaroszewski L, Jin KK, Klock HE, Knuth MW, Kozbial P, Krishna SS, Kumar A, Marciano D, McMullan D, Morse AT, Nigoghossian E, Nopakun A, Okach L, Puckett C, Reyes R, Rife CL, Sefcovic N, Tien HJ, Trame CB, van den Bedem H, Weekes D, Wooten T, Xu Q, Hodgson KO, Wooley J, Elsliger MA, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Wilson IA. 2010. The structure of BVU2987 from *Bacteroides vulgatus* reveals a superfamily of bacterial periplasmic proteins with possible inhibitory function. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 66:1265–1273. <https://doi.org/10.1107/S1744309109046788>
35. Gyun Kang S, Ung Park H, Sook Lee H, Tae Kim H, Joon Lee K. 2000. New beta-lactamase inhibitory protein (BLIP-I) from *Streptomyces exfoliatus* SMF19 and its roles on the morphological differentiation. *J Biol Chem* 275:16851–16856. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000227200>
36. Ochsner UA, Vasil AI, Johnson Z, Vasil ML. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* fur overlaps with a gene encoding a novel outer membrane lipoprotein, OmlA. *J Bacteriol* 181:1099–1109. <https://doi.org/10.1128/JB.181.4.1099-1109.1999>
37. Sklar JG, Wu T, Gronenberg LS, Malinverni JC, Kahne D, Silhavy TJ. 2007. Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6400–6405. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701579104>
38. Yeats C, Rawlings ND, Bateman A. 2004. The PepSY domain: a regulator of peptidase activity in the microbial environment? *Trends Biochem Sci* 29:169–172. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.02.004>
39. Sayer CV, Popham DL. 2019. YpeB dimerization may be required to stabilize SleB for effective germination of *Bacillus anthracis* spores. *BMC Microbiol* 19:169. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1544-1>
40. Li Y, Butzin XY, Davis A, Setlow B, Korza G, Üstok F, Christie G, Setlow P, Hao B. 2013. Activity and regulation of various forms of CwlJ, SleB, and YpeB proteins in degrading cortex peptidoglycan of spores of *Bacillus* species *in vitro* and during spore germination. *J Bacteriol* 195:2530–2540. <https://doi.org/10.1128/JB.00259-13>
41. Tzanis A, Dalton KA, Hesketh A, den Hengst CD, Buttner MJ, Thibessard A, Kelemen GH. 2014. A sporulation-specific, sigF-dependent protein, SspA, affects septum positioning in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 91:363–380. <https://doi.org/10.1111/mmi.12466>
42. Bernhards CB, Chen Y, Toutkoushian H, Popham DL. 2015. HtrC is involved in proteolysis of YpeB during germination of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol* 197:326–336. <https://doi.org/10.1128/JB.02344-14>
43. Wei Y, Havasy T, McPherson DC, Popham DL. 2003. Rod shape determination by the *Bacillus subtilis* class B penicillin-binding proteins encoded by *pbpA* and *pbpH*. *J Bacteriol* 185:4717–4726. <https://doi.org/10.1128/JB.185.16.4717-4726.2003>
44. Berg KH, Stamsås GA, Straume D, Håvarstein LS. 2013. Effects of low Pbp2B levels on cell morphology and Peptidoglycan composition in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol* 195:4342–4354. <https://doi.org/10.1128/JB.00184-13>
45. Land AD, Winkler ME. 2011. The requirement for pneumococcal MreC and MreD is relieved by inactivation of the gene encoding PBP1a. *J Bacteriol* 193:4166–4179. <https://doi.org/10.1128/JB.05245-11>
46. O'Reilly FJ, Graziadei A, Forbrig C, Bremenkamp R, Charles K, Lenz S, Elfmann C, Fischer L, Stülke J, Rappsilber J. 2023. Protein complexes in cells by AI-assisted structural proteomics. *Mol Syst Biol* 19:e11544. <https://doi.org/10.15252/msb.202311544>
47. Dion MF, Kapoor M, Sun Y, Wilson S, Ryan J, Vigouroux A, van Teeffelen S, Oldenbourg R, Garner EC. 2019. *Bacillus subtilis* cell diameter is determined by the opposing actions of two distinct cell wall synthetic systems. *Nat Microbiol* 4:1294–1305. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0439-0>
48. Perez AJ, Boersma MJ, Bruce KE, Lamanna MM, Shaw SL, Tsui H-C, Taguchi A, Carlson EE, VanNieuwenhze MS, Winkler ME. 2021. Organization of peptidoglycan synthesis in nodes and separate rings at different stages of cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 115:1152–1169. <https://doi.org/10.1111/mmi.14659>
49. Pasquina-Lemonche L, Burns J, Turner RD, Kumar S, Tank R, Mullin N, Wilson JS, Chakrabarti B, Bullough PA, Foster SJ, Hobbs JK. 2020. The architecture of the Gram-positive bacterial cell wall. *Nature* 582:294–297. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2236-6>
50. Straume D, Piechowiak KW, Kjos M, Håvarstein LS. 2021. Class A PBPs: it is time to rethink traditional paradigms. *Mol Microbiol* 116:41–52. <https://doi.org/10.1111/mmi.14714>
51. Morlot C, Bayle L, Jacq M, Fleurie A, Tourcier G, Galisson F, Vernet T, Grangeasse C, Di Guilmi AM. 2013. Interaction of penicillin-binding protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in

- Streptococcus pneumoniae* R6 morphogenesis. *Mol Microbiol* 90:88–102. <https://doi.org/10.1111/mmi.12348>
52. Stamsås GA, Straume D, Ruud Winther A, Kjos M, Frantzen CA, Håvarstein LS. 2017. Identification of EloR (Spr1851) as a regulator of cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 105:954–967. <https://doi.org/10.1111/mmi.13748>
53. Zheng JJ, Perez AJ, Tsui H-C, Massidda O, Winkler ME. 2017. Absence of the KhpA and KhpB (JAG/Elor) RNA-binding proteins suppresses the requirement for Pbp2b by overproduction of FtsA in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol* 106:793–814. <https://doi.org/10.1111/mmi.13847>
54. Ulrych A, Holečková N, Goldová J, Doubravová L, Benada O, Kofroňová O, Halada P, Branny P. 2016. Characterization of pneumococcal Ser/Thr protein phosphatase phpP mutant and identification of a novel PhpP substrate, putative RNA binding protein Jag. *BMC Microbiol* 16:247. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0865-6>
55. Martin B, Prudhomme M, Alloing G, Granadel C, Claverys JP. 2000. Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 38:867–878. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02187.x>
56. Berg KH, Biørnstad TJ, Straume D, Håvarstein LS. 2011. Peptide-regulated gene depletion system developed for use in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 193:5207–5215. <https://doi.org/10.1128/JB.05170-11>
57. Sung CK, Li H, Claverys JP, Morrison DA. 2001. An rpsL cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* 67:5190–5196. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5190-5196.2001>
58. Morlot C, Zapun A, Dideberg O, Vernet T. 2003. Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol Microbiol* 50:845–855. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03767.x>
59. Fleurie A, Cluzel C, Guiral S, Fretton C, Galisson F, Zanella-Cleon I, Di Guilmi A-M, Grangeasse C. 2012. Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 83:746–758. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07962.x>
60. Job V, Di Guilmi AM, Martin L, Vernet T, Dideberg O, Dessen A. 2003. Structural studies of the transpeptidase domain of PBP1a from *Streptococcus pneumoniae*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59:1067–1069. <https://doi.org/10.1107/s0907444903006954>

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

### **The morphogenic protein CopD controls the spatio-temporal dynamics of PBP1a and PBP2b in *Streptococcus pneumoniae***

Cassandra Lenoir<sup>1</sup>, Anaïs Pelletier<sup>1</sup>, Sylvie Manuse<sup>1</sup>, Hugo Millat<sup>1</sup>, Adrien Ducret<sup>1</sup>, Anne Galinier<sup>2</sup>, Thierry Doan<sup>3</sup> and Christophe Grangeasse<sup>1,#</sup>

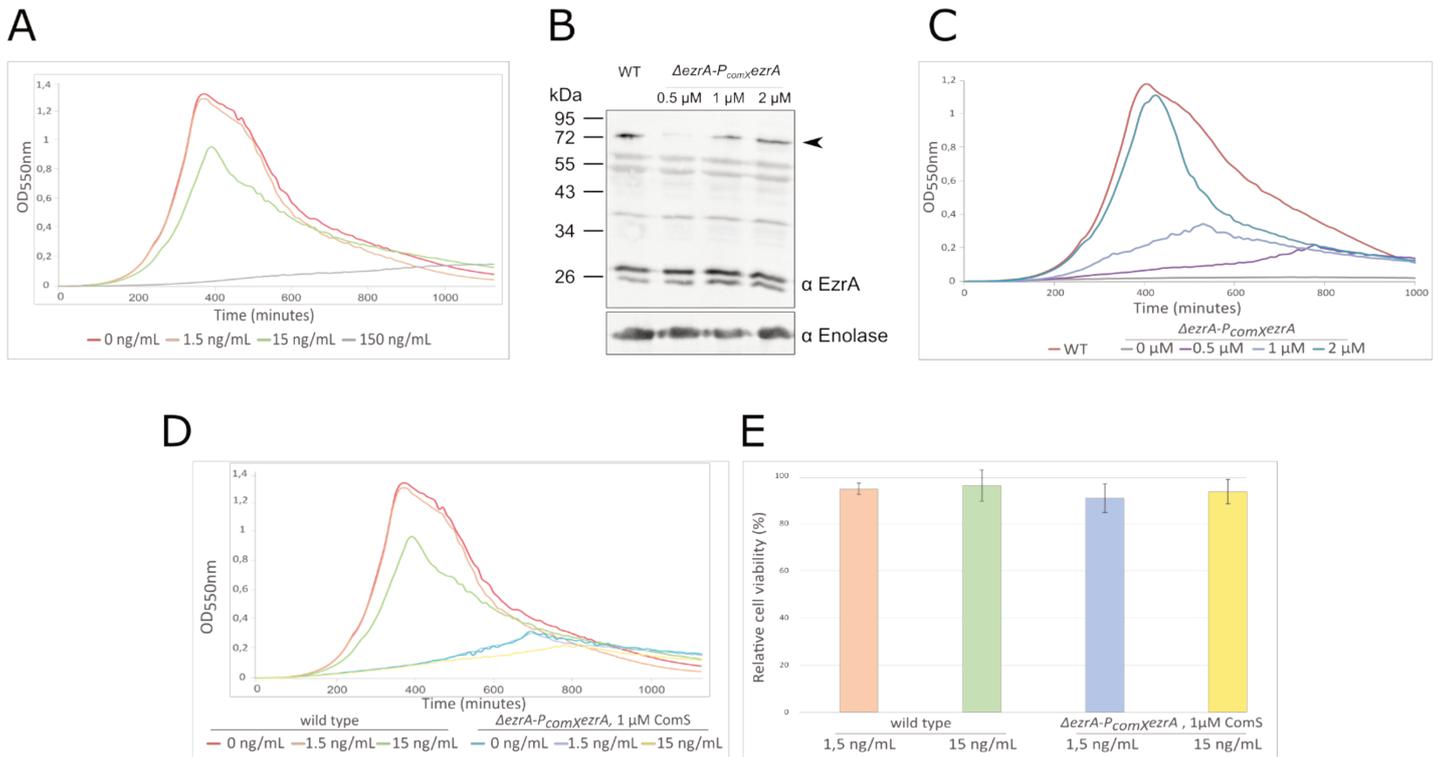
<sup>1</sup> Molecular Microbiology and Structural Biochemistry, UMR 5086, Université de Lyon, CNRS, Lyon, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Biochimie Bactérienne, UMR 7283, Aix-Marseille Université, CNRS, Marseille, France.

<sup>3</sup> Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, UMR 7255, Aix-Marseille Université, Marseille, France.

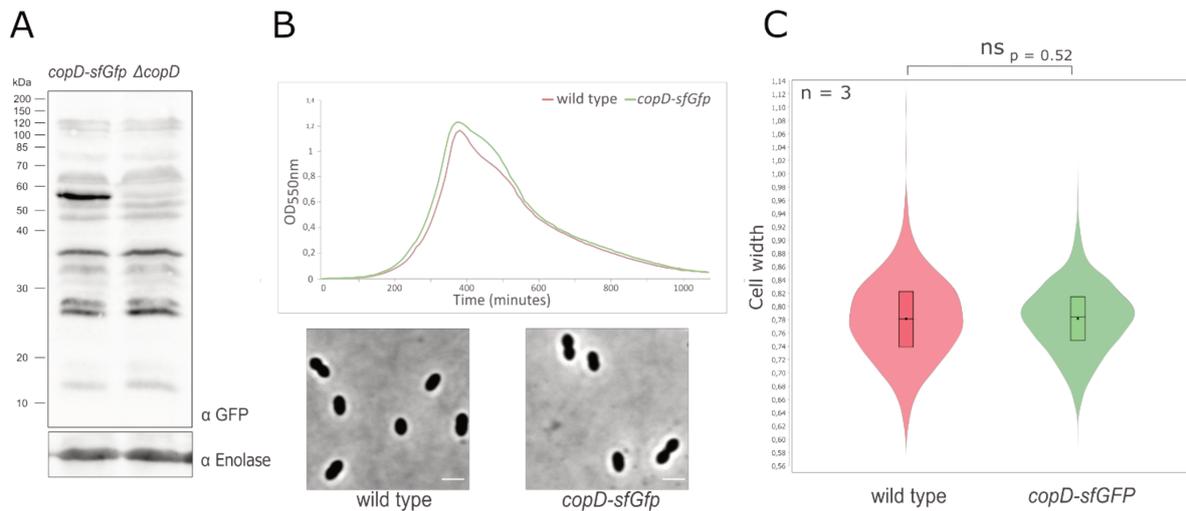
Anaïs Pelletier and Cassandra Lenoir contributed equally to this work and are co-first authors.

# Correspondence should be addressed to Christophe Grangeasse  
[christophe.grangeasse@ibcp.fr](mailto:christophe.grangeasse@ibcp.fr)

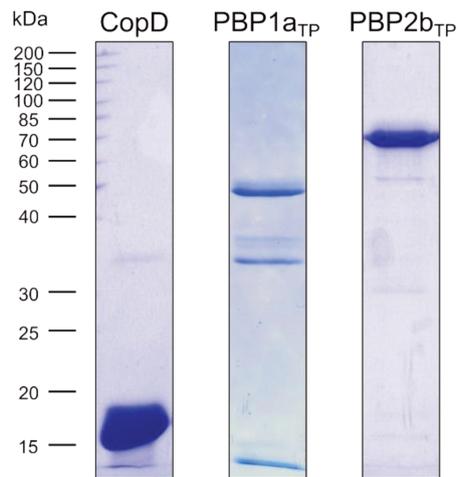


**Figure S1: Effect of tetracycline and/or *ezrA*-depletion on cell growth and viability.** (A)

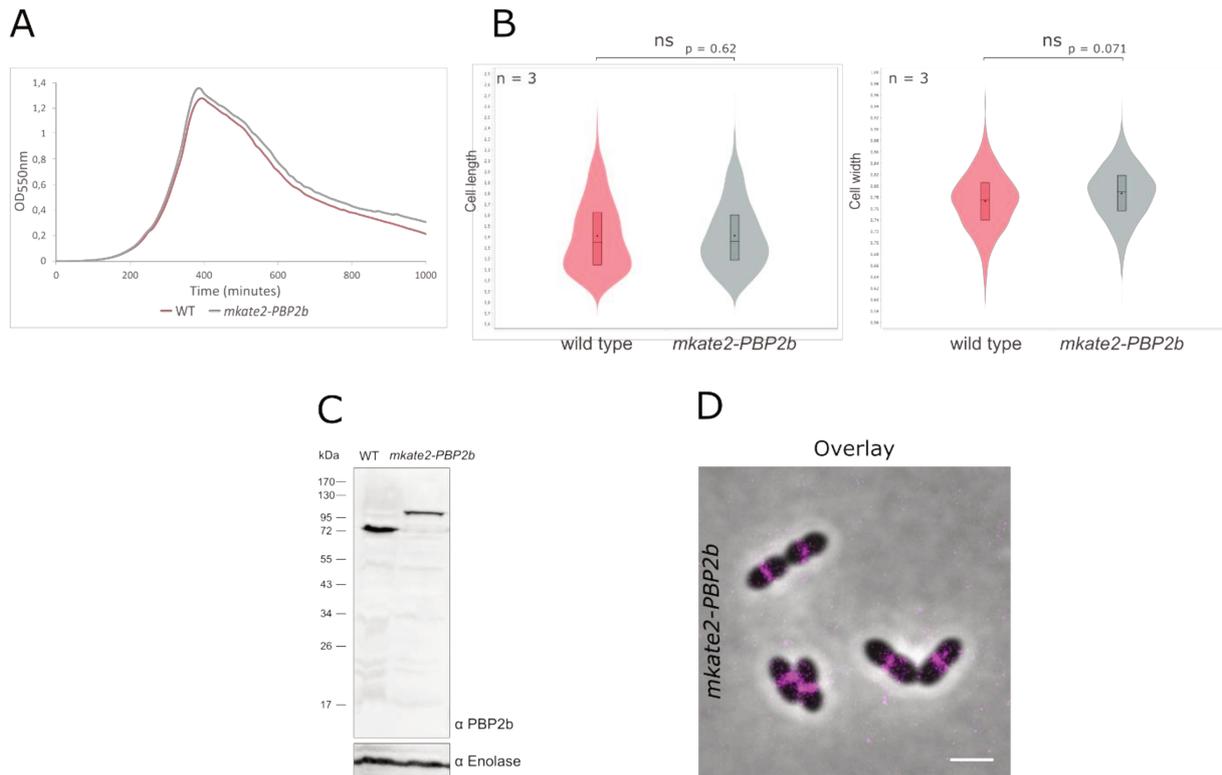
WT cells were grown in C+Y medium at 37°C in the presence of increasing concentration of tetracycline. The OD<sub>550</sub> was read automatically every 10 min. (B) Western immunoblot of whole-cell lysates from  $\Delta$ ezrA-*P<sub>comX</sub>*ezrA cells, grown to exponential phase in the presence (0.5, 1 or 2  $\mu$ M) of the ComS inducer, were probed with specific anti-EzrA ( $\alpha$  EzrA) antibody. To estimate the relative quantity of proteins in crude extract and to compare the different lanes, we used enolase (Spr1036) as an internal standard. The enolase was detected using specific antibodies ( $\alpha$  Enolase) and is presented in the lower part of the Figure. EzrA is indicated with a black arrow. (C)  $\Delta$ ezrA-*P<sub>comX</sub>*ezrA cells were grown in C+Y medium at 37°C in the absence or presence of decreasing concentration of ComS from 2 to 0  $\mu$ M. The OD<sub>550</sub> was read automatically every 10 min. (D) Growth curves of WT and  $\Delta$ ezrA-*P<sub>comX</sub>*ezrA strains (+ 1  $\mu$ M ComS) in presence of 1.5 ng/ml or 15 ng/ml of tetracycline. (E) Relative cell viability of  $\Delta$ ezrA-*P<sub>comX</sub>*ezrA (+ 1  $\mu$ M ComS) compared to WT cells in the presence of 1.5 ng/ml or 15 ng/ml of tetracycline. Bar chart represents the mean  $\pm$  SEM.



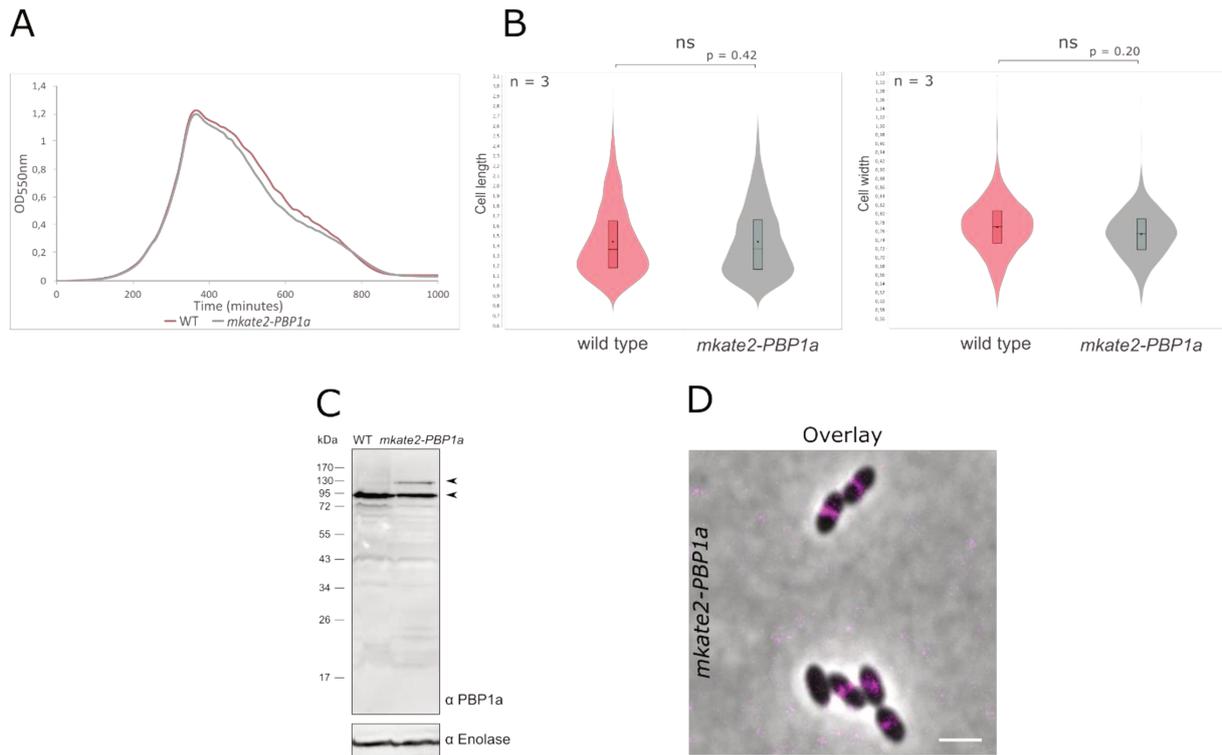
**Figure S2: Expression and functionality of the CopD-sfGFP fusion.** (A) The Western immunoblot was probed with specific anti-GFP antibodies ( $\alpha$  GFP) to determine *copD* expression in *copD-sfGfp* cells. To estimate the relative quantity of proteins in crude extract and to compare the different lanes, we used enolase (Spr1036) as an internal standard. The enolase was detected using specific antibodies ( $\alpha$  Enolase) and is presented in the lower part of the Figure. (B) Growth of WT and *copD-sfGfp* strains. Strains were grown in C+Y medium at 37°C in a spectrophotometer. The OD<sub>550</sub> was read automatically every 10 min. Representative phase contrast microscopy images of WT and *copD-sfGfp* cells are shown below the growth curves. Scale bar, 2  $\mu$ m. (C) Corresponding violin plot show the distribution of the cell width as determined using MicrobeJ (56). The distribution of the cell width is shown in red for the WT strain and in green for the *copD-sfGfp* strain. The box indicates the 25th to the 75th percentile, and the whiskers indicate the minimum and the maximum values. The mean and the median are indicated with a dot and a line in the box, respectively. Statistical comparison was done using t-test. n=3 indicates the number of independent experiments with a total of 8000 cells analyzed.



**Figure S3: Purification of CopD<sub>ED</sub>, PBP1a<sub>TP</sub> and PBP2b<sub>TP</sub>.** Proteins were overproduced in *E. coli* BL21 as 6his-tagged fusion proteins. After purification using a Ni-NTA resin, purified proteins were analyzed by SDS-PAGE.



**Figure S4: Validation of the *mkate2-PBP2b* fusion.** (A) Growth curves of WT and *mkate2-PBP2b* cells in C+Y medium at 37°C. The OD<sub>550</sub> was read automatically every 10 min. (B) Violin plot showing the distribution of the cell length (left panel) and cell width (right panel) for WT (red) and *mkate2-PBP2b* (grey) strains as determined using MicrobeJ (56). The box indicates the 25th to the 75th percentile, and the whiskers indicate the minimum and the maximum values. The mean and the median are indicated with a dot and a line in the box, respectively. Statistical comparison was done using t-test. n=3 indicates the number of independent experiments with a total of 10 000 cells analyzed. (C) Expression of *mkate2-PBP2b*. *mkate2-PBP2b* represents the only source of PBP2b from its endogenous chromosomal locus. After SDS-PAGE and electro-blotting, the membrane was probed with anti-PBP2b antibody. As control, WT cells were also analyzed. (D) Overlays between phase-contrast and mKate2 images of *mkate2-PBP2b* cells. Scale bar, 2 μm.



**Figure S5: Validation of the *mkate2-PBP1a* fusion.** (A) Growth curves of WT and *P<sub>Zn</sub>-mkate2-PBP1a* cells in C+Y medium at 37°C. The OD<sub>550</sub> was read automatically every 10 min. (B) Violin plot showing the distribution of the cell length (left panel) and cell width (right panel) for WT (red) and *mkate2-PBP1a* (grey) strains as determined using MicrobeJ (56). The box indicates the 25th to the 75th percentile, and the whiskers indicate the minimum and the maximum values. The mean and the median are indicated with a dot and a line in the box, respectively. Statistical comparison was done using t-test. n=3 indicates the number of independent experiments with a total of 10 000 cells analyzed. (C) Expression of *mkate2-PBP1a*. The merodiploid strain *P<sub>Zn</sub>-mkate2-PBP1a* expresses the chromosomal *PBP1a* and the ectopic *mkate2-PBP1a* fusion under the control of the zinc-inducible *P<sub>Zn</sub>* promoter. The two forms are indicated by arrows. After SDS-PAGE and electro-blotting, the membrane was probed with anti-PBP1a antibody. As control, WT cells were also analyzed. (D) Overlays between phase-contrast and *mkate2* images of *P<sub>Zn</sub>-mkate2-PBP1a* cells. Scale bar, 2 μm.

**Table S1 - Strains and plasmids used in this study**

Strain	Genotype and description	Reference	Primers (Table S2)
<i>S. pneumoniae</i> strains			
R800	<i>S. pneumoniae</i> R6 derivative	Gift from J.-P. Claverys, Toulouse, France	
Wild type	R800 <i>rpsL1</i>	Gift from J.-P. Claverys, Toulouse, France	
<i>copD</i> :: <i>Janus</i>	R800 <i>rpsL1</i> , <i>copD</i> :: <i>kan-rpsL</i> ; <i>Kan<sup>R</sup></i>	This study	1, 2, 3, 4, 5, 6
$\Delta$ <i>copD</i>	R800 <i>rpsL1</i> , $\Delta$ <i>copD</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	This study	1, 2, 7, 8
<i>copD</i> - $\Delta$ <i>PepSY</i>	R800 <i>rpsL1</i> , <i>copD</i> - $\Delta$ <i>PepSY</i> (A57-L162); <i>Str<sup>R</sup></i>	This study	1, 2, 9, 10
<i>copD</i> - <i>sfGfp</i>	R800 <i>rpsL1</i> , <i>copD</i> - <i>sfGfp</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	This study	1, 2, 10, 11, 12, 13
<i>P<sub>comX</sub></i> - <i>copD</i>	R800 <i>rpsL1</i> , $\Delta$ <i>IS1167</i> :: <i>P1</i> :: <i>P<sub>comR</sub></i> - <i>comR</i> , <i>cpsN-O</i> :: <i>P<sub>comX</sub></i> - <i>copD</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	This study	14, 15, 16, 17, 18, 19
<i>copD</i> :: <i>Janus</i> - <i>P<sub>comX</sub></i> - <i>copD</i>	R800 <i>rpsL1</i> , $\Delta$ <i>IS1167</i> :: <i>P1</i> :: <i>P<sub>comR</sub></i> - <i>comR</i> , <i>cpsN-O</i> :: <i>P<sub>comX</sub></i> - <i>copD</i> , <i>copD</i> :: <i>kan-rpsL</i> ; <i>Kan<sup>R</sup></i>	This study	1, 2
$\Delta$ <i>copD</i> - <i>P<sub>comX</sub></i> - <i>copD</i> ,	R800 <i>rpsL1</i> , $\Delta$ <i>IS1167</i> :: <i>P1</i> :: <i>P<sub>comR</sub></i> - <i>comR</i> , <i>cpsN-O</i> :: <i>P<sub>comX</sub></i> - <i>copD</i> , $\Delta$ <i>copD</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	This study	1, 2
<i>P<sub>comX</sub></i> - <i>sfGfp</i>	R800 <i>rpsL1</i> , $\Delta$ <i>IS1167</i> :: <i>P1</i> :: <i>P<sub>comR</sub></i> - <i>comR</i> , <i>cpsN-O</i> :: <i>P<sub>comX</sub></i> - <i>sfGfp</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	This study	14, 15, 16, 17, 20, 21
<i>gfp</i> - <i>PBP2b</i>	R800 <i>rpsL1</i> , <i>gfp</i> - <i>PBP2b</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	This study	22, 23, 24, 25, 26
<i>copD</i> :: <i>Janus</i> - <i>gfp</i> - <i>PBP2b</i>	R800 <i>rpsL1</i> , <i>gfp</i> - <i>PBP2b</i> , <i>copD</i> :: <i>kan-rpsL</i> ; <i>Kan<sup>R</sup></i>	This study	1, 2
$\Delta$ <i>copD</i> - <i>gfp</i> - <i>PBP2b</i>	R800 <i>rpsL1</i> , <i>gfp</i> - <i>PBP2b</i> , $\Delta$ <i>copD</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	This study	1, 2
<i>P<sub>Zn</sub></i> - <i>gfp</i> - <i>PBP1a</i>	R800 <i>rpsL1</i> , <i>bgaA</i> :: <i>P<sub>Zn</sub></i> - <i>gfp</i> - <i>PBP1a</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i> <i>Tet<sup>R</sup></i>	Gift from C. Morlot	
<i>copD</i> :: <i>Janus</i> - <i>P<sub>Zn</sub></i> - <i>gfp</i> - <i>PBP1a</i>	R800 <i>rpsL1</i> , <i>bgaA</i> :: <i>P<sub>Zn</sub></i> - <i>gfp</i> - <i>PBP1a</i> , <i>copD</i> :: <i>kan-rpsL</i> ; <i>Kan<sup>R</sup></i> <i>Tet<sup>R</sup></i>	This study	1, 2
$\Delta$ <i>copD</i> - <i>P<sub>Zn</sub></i> - <i>gfp</i> - <i>PBP1a</i>	R800 <i>rpsL1</i> , <i>bgaA</i> :: <i>P<sub>Zn</sub></i> - <i>gfp</i> - <i>PBP1a</i> , $\Delta$ <i>copD</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i> <i>Tet<sup>R</sup></i>	This study	1, 2
<i>copD</i> :: <i>Janus</i> - <i>gfp</i> - <i>PBP2b</i>	R800 <i>rpsL1</i> , <i>gfp</i> - <i>PBP2b</i> , <i>copD</i> :: <i>kan-rpsL</i> ; <i>Kan<sup>R</sup></i>	This study	1, 2
<i>gfp</i> - <i>ftsA</i>	R800 <i>rpsL1</i> , <i>gfp</i> - <i>ftsA</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	1	
<i>copD</i> - <i>sfGfp</i> - <i>gfp</i> - <i>PBP2b</i>	R800 <i>rpsL1</i> , <i>gfp</i> - <i>PBP2b</i> , <i>copD</i> - <i>sfGfp</i> ; <i>Str<sup>R</sup></i>	This study	1, 2
<i>P<sub>Zn</sub></i> - <i>mkate2</i> - <i>PBP1a</i>	R800 <i>rpsL1</i> , <i>P<sub>Zn</sub></i> - <i>mkate2</i> - <i>PBP1a</i> , <i>Str<sup>R</sup></i> <i>Tet<sup>R</sup></i>	Gift from C. Morlot	
<i>copD</i> :: <i>Janus</i> - <i>P<sub>Zn</sub></i> - <i>mkate2</i> - <i>PBP1a</i>	R800 <i>rpsL1</i> , <i>P<sub>Zn</sub></i> - <i>mkate2</i> - <i>PBP1a</i> , <i>copD</i> :: <i>kan-rpsL</i> , <i>Kan<sup>R</sup></i> <i>Tet<sup>R</sup></i>	This study	1, 2
<i>copD</i> - <i>sfgfp</i> - <i>P<sub>Zn</sub></i> - <i>mkate2</i> - <i>PBP1a</i>	R800 <i>rpsL1</i> , <i>P<sub>Zn</sub></i> - <i>mkate2</i> - <i>PBP1a</i> , <i>copD</i> - <i>sfgfp</i> , <i>Str<sup>R</sup></i> <i>Tet<sup>R</sup></i>	This study	1, 2

<i>mkate2-PBP2b</i>	<i>R800 rpsL1, mkate2-PBP2b, Str<sup>R</sup></i>	This study	22, 23, 25, 27, 28
<i>copD::Janus-mkate2-PBP2b</i>	<i>R800 rpsL1, mkate2-PBP2b, copD::kan-rpsI, Kan<sup>R</sup></i>	This study	1, 2
<i>copD-sfGfp-mkate2-PBP2b</i>	<i>R800 rpsL1, mkate2-PBP2b, copD-sfGfp, Str<sup>R</sup></i>	This study	1, 2
<i>P<sub>comX</sub>-ezrA</i>	<i>R800 rpsL1, ΔIS1167::P1::P<sub>comR</sub>-comR, cpsN-O::P<sub>comX</sub>-ezrA, Str<sup>R</sup></i>	This study	14, 15, 16, 17, 29, 30
<i>ezrA-Janus</i>	<i>R800 rpsL1, ezrA-kan-rpsI; Kan<sup>R</sup></i>	This study	3, 4, 31, 32, 33, 34
<i>ezrA-Janus-P<sub>comX</sub>-ezrA</i>	<i>R800 rpsL1, ΔIS1167::P1::P<sub>comR</sub>-comR, cpsN-O::P<sub>comX</sub>-ezrA, ezrA-kan-rpsI; Kan<sup>R</sup></i>	This study	31, 32
<i>ΔezrA-P<sub>comX</sub>-ezrA</i>	<i>R800 rpsL1, ΔIS1167::P1::P<sub>comR</sub>-comR, cpsN-O::P<sub>comX</sub>-ezrA, ΔezrA; Str<sup>R</sup></i>	This study	31, 32, 35, 36
<b><i>E. coli</i> strains</b>			
<i>XL1-Blue</i>	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-F'[proAB + lac<sup>I</sup>lacZΔM15 Tn10 (Tc<sup>R</sup>)]</i>	2	
<i>BTH101</i>	<i>F-, cya-99, araD139, galE15, galk16, rpsL1 (Str<sup>R</sup>), hsdR2, mcrA1, mcrB1</i>	Euromedex	
<i>BL21 (DE3)</i>	<i>F-, ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	3	
<i>BL21 star (DE3)</i>	<i>F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>(λ<sup>S</sup>)</i>	Invitrogen	
<b>Plasmids</b>			
<i>pETPhos-copD (extra)</i>	<i>pETPhos derivative, encoding CopD, from Met38 to Leu162, Amp<sup>R</sup></i>	This study	37, 38
<i>pETPhos-PBP2b (extra)</i>	<i>pETPhos derivative, encoding PBP2b, from Met39 to Asn685, Amp<sup>R</sup></i>	This study	39, 40
<i>pETPhos-PBP1a (extra)</i>	<i>pETPhos derivative, encoding PBP1a, from Ser37 to Pro719, Amp<sup>R</sup></i>	This study	41, 42
<i>pKT25</i>	<i>P<sub>lac</sub>-T25- kan pACYC ori</i>	4	
<i>pUT18C</i>	<i>P<sub>lac</sub>-T18-, bla</i>	4	
<i>pKT25-zip</i>	<i>P<sub>lac</sub>-T25-leucine zipper region from yeast GCN4. kan pACYC ori</i>	4	
<i>pUT18C-zip</i>	<i>P<sub>lac</sub>-T18-leucine zipper region from yeast GCN4. bla</i>	4	
<i>PUT18C-pbp2b</i>	<i>P<sub>lac</sub>-T18-PBP2b bla pUC ori</i>	5	
<i>PUT18C-pbp2x</i>	<i>P<sub>lac</sub>-T18-PBP2x bla pUC ori</i>	This study	43, 44
<i>PUT18C-PBP2x/PBP2bT M-CD</i>	<i>P<sub>lac</sub>-T18-PBP2b(Met1-Tyr38)-PBP2x(Thr52-Asp750) bla pUC ori</i>	This study	45, 46, 48, 49
<i>PUT18C-PBP2b/PBP2xT M-CD</i>	<i>P<sub>lac</sub>-T18-PBP2x(Met1-Gly51)-PBP2b(Met39-Asn685) bla pUC ori</i>	This study	47, 48, 49, 50
<i>PUT18C-pbp1a</i>	<i>P<sub>lac</sub>-T18-PBP1a bla pUC ori</i>	6	
<i>PUT18C-pbp2a</i>	<i>P<sub>lac</sub>-T18-PBP2a bla pUC ori</i>	6	
<i>PUT18C-PBP2a/PBP1aT M-CD</i>	<i>P<sub>lac</sub>-T18-PBP1a(Met1-Ser37)-PBP2a(Ser79-Arg731) bla pUC ori</i>	This study	51, 52, 53, 54

<i>PUT18C-PBP1α/PBP2aT M-CD</i>	<i>P<sub>lac</sub>-T18-PBP2a(Met1-Lys78)-PBP1α(Lys38-Pro719) bla pUC ori</i>	This study	48, 55, 56, 57
<i>pKT25-copD</i>	<i>P<sub>lac</sub>-T25-copD kan pACYC ori</i>	This study	57, 58, 59, 60

## References

- 1 – Mercy C, Ducret A, Slager J, Lavergne J.P, Fretton C, Narayanan Nagarajan S, Garcia P, Noiro-Gros M.F, Dubarry N, Nourikyan J, Veening J.W, Grangeasse C. RocS drives chromosome segregation and nucleoid occlusion in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Microbiology* 4: 1661-1670 (2019).
- 2 - Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & short, J. M. A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376 (1987).
- 3 - Studier, F. W. & Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130 (1986).
- 4 - Karimova G, Ullmann A, Ladant D. Protein-Protein Interaction Between *Bacillus stearotherophilus* Tyrosyl-tRNA Synthetase Subdomains Revealed by a Bacterial Two-Hybrid System. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3(1):73–82 (2001).
- 5 - Straume, Stamsås, Berg, Salehian, Håvarstein. Identification of pneumococcal proteins that are functionally linked to penicillin-binding protein 2b (PBP2b). *Molecular Microbiology* (2017) 103(1), 99–116 (2016).
- 6 - Fenton AK, Mortaji LE, Lau DTC, Rudner DZ, Bernhardt TG. CozE is a member of the MreCD complex that directs cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Microbiology* 2(0):1–9 (2016).

**Table S2 - List of primers**

Number	Name	Sequence 5'-3'
1	Upstream of <i>copD</i> (-635) (+)	CACTGTACCAGGGATAGAGAAG
2	Downstream of <i>copD</i> (+1134) (-)	CACCATTGATGACCACTGTTTGC
3	Janus cassette (+)	CCGTTTGATTTTTAATGGATAATG
4	Janus cassette (-)	AGAGACCTGGGCCCTTTCC
5	Janus / Upstream of <i>copD</i> (-1) (-)	CATTATCCATTA AAAATCAAACGGCCCT AGACCATACTGCCACAG
6	Janus / Downstream of <i>copD</i> (+488) (+)	GGAAAGGGGCCAGGTCTCTGGTCAAT AAGGAGGGCCTATG
7	Upstream of <i>copD</i> (-1) (-)	CCCTAGACCATACTGCCACAG
8	Downstream of <i>copD</i> (+411) (+)	CTGTGGCAGTATGGTCTAGGGGGTCAA TAAGGAGGGCCTATG
9	<i>copD-ΔPepSY</i> (+)	AACTATCCAACCGTGTT
10	<i>copD-ΔPepSY</i> (-)	ACACGGTTGGATAGTTTCAATACTGCTG AGCT
11	Linker / <i>copD</i> (+429) (-)	CTGCAGGAACCTCGATGTCTAGTTTTAGG CCCTCCTATTGACC

12	<i>sfGfp</i> (-)	TTATTTGTAGAGCTCATCCATGCCG
13	<i>copD</i> / <i>sfGfp</i> (+)	CGGCATGGATGAGCTCTACAAATAAGG TCAATAAGGAGGGCCTATG
14	<i>cpsN</i> (+308) (+)	CATCGGAACCTATACTCTTTTAG
15	<i>cpsO</i> (+800) (-)	ATAACAAATCCAGTAGCTTTGG
16	$P_{comX}$ (0) (+)	TGAACCTCCAATAATAAATAAATAAAT
17	<i>cpsN</i> /0 (+1106) (+)	TTTCTAATATGTAACCTCTCCCAAT
18	<i>cpsN</i> / <i>copD</i> (-)	ATTGGGAAGAGTTACATATTAGAAATCA TAGGCCCTCCTTATTGAC
19	$P_{comX}$ / <i>copD</i> (+)	ATTTATATTTATTATTGGAGGTTCAATGA AAAAAAGACAAAACAAAGCAAAAAATA ATC
20	$P_{comX}$ / <i>sfGfp</i> (+)	TATTTATTATTGGAGGTTCAATGTCTAAA GGTGAAGAGTT
21	<i>cpsN</i> / <i>sfGfp</i> (-)	GAAGAGTTACATATTAGAAATTATTTGT ACAATTCATCCA
22	Upstream of <i>PBP2b</i> (-658) (+)	GCCGCTTGGTCTGTCAAAGCTTC
23	Downstream of <i>PBP2b</i> (+2725) (-)	CACTATACAAAAGAGGCCGATAGG
24	<i>gfp</i> / linker (-)	TCCGGATCCCTCGAGTTTATACAATTCAT CCATACCATGTG
25	Linker / <i>PBP2b</i> (+)	CTCGAGGGATCCGGAATGAGACTGATT TGTATGA
26	Upstream of <i>PBP2b</i> / <i>gfp</i> (+)	AGATTTTAAGTTAGAAATGATTTCTAAA GGTG
27	<i>rfp</i> / linker (-)	TCCGGATCCCTCGAGCAATTTACTAGGC AAAT
28	Upstream of <i>PBP2b</i> / <i>rfp</i> (+)	AGATTTTAAGTTAGAAATGAAACATCTT ACCG
29	$P_{comX}$ / <i>ezrA</i> (+)	ATTTATATTTATTATTGGAGGTTCAATGT CTAATGGACAATAATTTATTTAATGG
30	<i>cpsN</i> / <i>ezrA</i> (-)	ATTGGGAAGAGTTACATATTAGAAATTA AAAACGAATCGTTTCACGTGTTTTTC
31	Upstream of <i>ezrA</i> (-587) (+)	CAGCCATGGGAACAGGATTTG
32	Downstream of <i>ezrA</i> (+2338) (-)	TTTATGATATTTAGCTGTACGAGAGTC
33	Upstream of Janus / <i>ezrA</i> (-)	CATTATCCATTA AAAATCAAACGGTTAA AAACGAATCGTTTCACGTGTTTTTC
34	Downstream of <i>ezrA</i> / Janus (+)	GGAAAGGGGCCAGGTCTCTTAAAAGA AAAAGATTTTATTGTGTGAGG
35	Downstream of <i>erzA</i> (+)	CGATTGTTTCAAGTAAAAAAGGAGTTTG ATTA AAAAGAAAAAGATTTTATTGTGTGA GGAGC
36	Upstream of <i>ezrA</i> (-)	GCTCCTCACACAATAAAATCTTTTTCTTT TAATCAAACCTCTTTTTTACTTGAAACAA TCG
37	Extracellular domain of <i>copD</i> with BamHI extension (-)	TATGGATCCTCATAGGCCCTCCTTATTGA CC
38	Extracellular domain of <i>copD</i> with NdeI extension (+)	TATCATATGAAACCTATCAAACAGCTA AAAG
39	<i>PBP2b</i> with BamHI extension (-)	TATGGATCCCTAATTCATTGGATGGTAT TTTTGATACAG

40	<i>PBP2b</i> with NdeI extension (+)	GGGAATCCATATGCAGGTTTTGAACAA GGATTTTTACG
41	<i>PBP1a</i> with BamH1 extension (-)	TATGGATCCTTATGGTTGTGCTGGTTGA G
42	<i>PBP1a</i> with NdeI extension (+)	GGGAATCCATATGAGCAAGGCTCCTA GCCTATCCG
43	<i>PBP2x</i> with Acc65I extension (-)	TATGGTACCCGTTAGTCTCCTAAAGTTA ATGTAATTTTTTAATG
44	<i>PBP2x</i> with XbaI extension (+)	TATTCTAGAGATGAAGTGGACAAAAG AGTAATC
45	<i>PBP2b</i> (M1-Y38) fused to <i>PBP2x</i> (T52-D750) (+)	TTGGTCGTTTGTGTATACTCGCTTTGGA ACAGA
46	<i>PBP2b</i> (M1-Y38) fused to <i>PBP2x</i> (T52-D750) (-)	TCTGTTCCAAAGCGAGTATACAACAAAC GACCAA
47	pKNT25/pUT18/pUT18C-GIBSON-XbaI (-)	CTCTAGAGTCGACCTGCAG
48	pKNT25/pUT18 (+)	GTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
49	<i>PBP2x</i> (M1-M51) fused to <i>PBP2b</i> (M39-N685) (+)	TCATTATTGGGACAGGCATGCAGTTTT GAACAA
50	<i>PBP2x</i> (M1-M51) fused to <i>PBP2b</i> (M39-N685) (-)	TTGTTCAAACCTGCATGCCTGTCCCAAT AATGA
51	<i>PBP1a</i> (M1-S37) fused to <i>PBP2a</i> (S79-R731) (+)	TTTTCTACTACGTTAGCTCGACCAATGTC AATGA
52	<i>PBP1a</i> (M1-S37) fused to <i>PBP2a</i> (S79-R731) (-)	TCATTGACATTGGTCGAGCTAACGTAGT AGAAAA
53	pUT18C (-)	TCGGGGCTGGCTTAACTA
54	pKNT25/pUT18C/pUT18 (+)	GTACCGAGCTCGAATTCA
55	<i>PBP2a</i> (M1-L78) fused to <i>PBP1a</i> (S38-P719) (+)	TGTTTGCTGTAGCCAAGAAGGCTCCTAG CCTATC
56	<i>PBP2a</i> (M1-L78) fused to <i>PBP1a</i> (L38-P719) (-)	GATAGGCTAGGAGCCTTCTTGGCTACAG CAAACA
57	pKT25-GIBSON-XbaI (-)	CTCTAGAGTCGACCCTGCAG
58	pKT25-GIBSON-Acc65I (+)	CGGGTACCTAAGTAACTAAGAATTC
59	<i>copD</i> with XbaI extension (-)	AGGGTCGACTCTAGAGGTGAAAAAAG ACAAA
60	<i>copD</i> with Acc65I extension (-)	TATGGTACCCGTAGGCCCTCCTTATTGA CCAATG



# Discussion

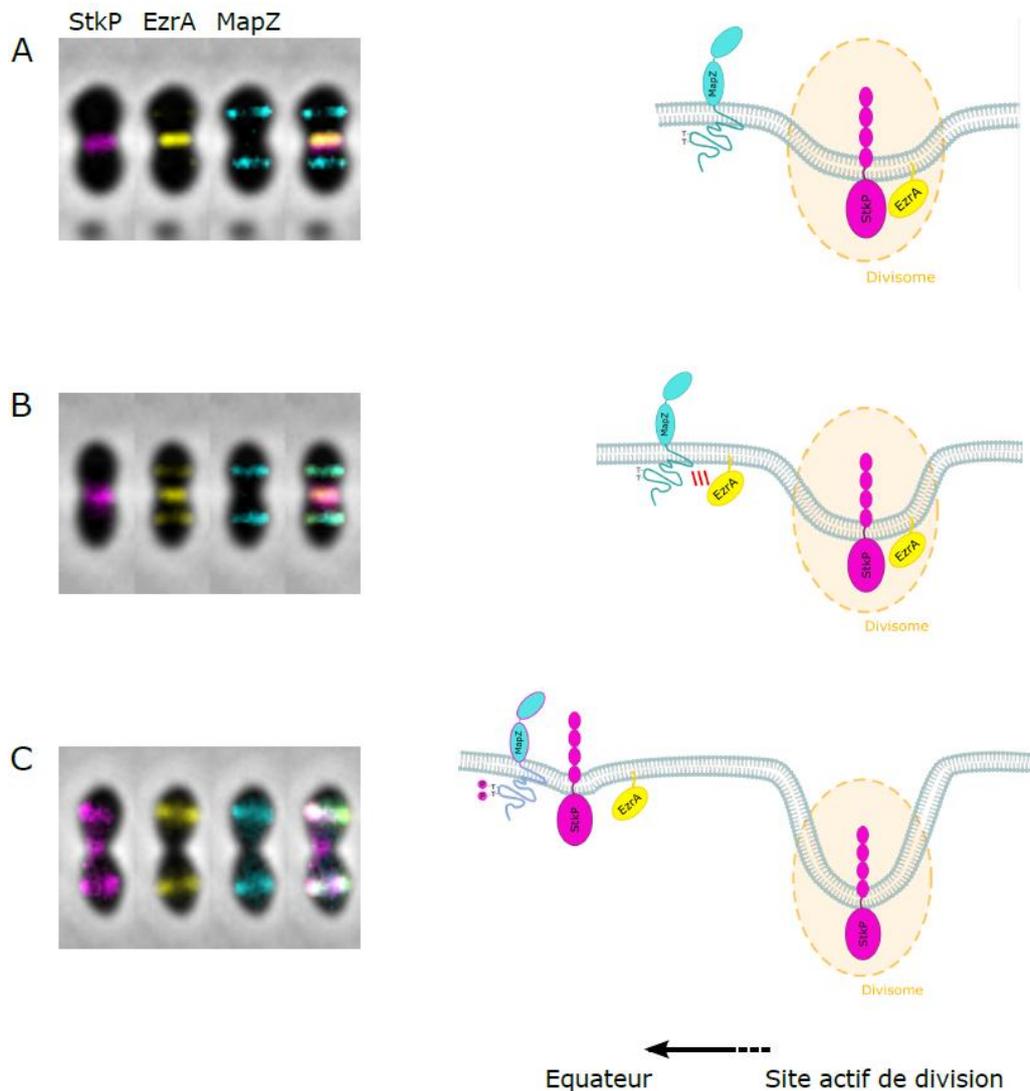


Figure 48 : Modèle pour l'interaction entre MapZ et EzrA aux stades précoces (A), avancés (B) et finaux (C) de la division cellulaire. Une image de cellule en contraste de phase superposée aux images d'épifluorescence est représentée pour chaque catégorie (panel de gauche). Les schémas représentent la localisation de chaque protéine (MapZ en bleu, EzrA en jaune, StkP en violet), au site actif de division et/ou aux équateurs cellulaires. A) Au début de la division cellulaire, MapZ (non phosphorylée) marque les équateurs des cellules filles alors que EzrA, StkP et les autres protéines du divisome (symbolisé par un ovale orange au site actif de division) sont localisées au centre de la cellule. B) Au cours de la division cellulaire, EzrA se relocalise aux futurs sites de division des cellules filles et interagit avec MapZ. C) Dans les stades tardifs de la division cellulaire, StkP se relocalise aux équateurs et phosphoryle MapZ. La phosphorylation de MapZ (représentée par des phosphates  $\text{P}$  violets aux sites de phosphorylation) casse l'interaction avec EzrA.

Chez le pneumocoque, le positionnement de la machinerie de division cellulaire est régulé positivement par la protéine MapZ. Cette protéine contient un domaine cytoplasmique intrinsèquement désordonné qui présente deux sites de phosphorylation, substrats de la sérine-thréonine protéine kinase StkP. Au cours de ma thèse, j'ai démontré que MapZ interagit avec la protéine du divisome EzrA. Cette observation vient soutenir une étude récente ayant identifié EzrA en complexe avec MapZ dans une expérience de co-immunoprécipitation (Perez et al., 2022). J'ai également montré que cette interaction est dépendante de l'état de phosphorylation de MapZ et qu'elle a lieu préférentiellement lorsque MapZ est déphosphorylée. J'ai ensuite montré que MapZ et EzrA co-localisent aux équateurs des cellules filles dans les stades tardifs de la division cellulaire, alors que StkP se localise toujours au site actif de division. Des expériences de microscopie par TIRF ont également permis de mettre en évidence que la dynamique de EzrA est fortement perturbée lorsque MapZ est constitutivement phosphorylée, un phénotype que l'on retrouve dans un mutant  $\Delta mapZ$ . MapZ agirait donc comme un interrupteur moléculaire, dont le niveau de phosphorylation modulerait son interaction avec EzrA et impacterait sa dynamique de relocalisation. Dans cette discussion, je m'attacherai à présenter différents éléments de réflexion liés aux observations faites au cours de cette étude.

- Quelle est la dynamique d'interaction entre MapZ et EzrA ?

Les observations réalisées au cours de cette étude, couplées à une expérience de colocalisation simultanée des trois protéines (MapZ, EzrA et StkP), nous ont permis d'établir un modèle pour expliquer la dynamique d'interaction de ces acteurs de la division cellulaire (Figure 48). Au stade précoce de la division cellulaire, MapZ, EzrA et StkP sont localisées au centre de la cellule. A mesure que la cellule s'allonge, MapZ est localisée majoritairement au niveau des équateurs des futures cellules filles et s'éloigne progressivement de la machinerie de division/élongation et plus spécifiquement de EzrA et StkP, qui restent localisées au niveau du site de division (Figure 48A). En supposant que le niveau de phosphorylation de MapZ soit directement lié à sa proximité géographique avec StkP (ce point est discuté plus



bas), nous pourrions donc supposer que les molécules de MapZ localisées au niveau des équateurs des futures cellules filles soient majoritairement sous forme non-phosphorylée. A un stade plus tardif de la division cellulaire, EzrA se relocalise au niveau des équateurs des futures cellules filles alors que les protéines tardives du divisome (dont StkP) persistent au site actif de division (Figure 48B). La présence de molécules de MapZ non-phosphorylées au niveau des équateurs des cellules filles favoriserait l'interaction avec EzrA et faciliterait son recrutement aux niveaux des futurs sites de division. Au stade final de la division cellulaire, StkP se relocalise aux niveaux des futurs sites de division en présence de MapZ et de EzrA, pour initier un nouveau cycle cellulaire. Du fait de la proximité géographique entre MapZ et StkP, nous pourrions supposer que les molécules de MapZ localisées au niveau du site actif de division soient majoritairement sous forme phosphorylée. La présence de molécules de MapZ phosphorylées réduirait son interaction avec EzrA et faciliterait leur séparation à mesure que MapZ s'éloigne progressivement du site actif de division (Figure 48C). La phosphorylation de MapZ serait donc un niveau de régulation supplémentaire permettant à EzrA de se relocaliser au bon endroit et au bon moment de la division cellulaire.

- Comment est régulé l'équilibre entre la phosphorylation/déphosphorylation de MapZ ?

Le modèle de travail exposé ci-dessus suppose que MapZ est déphosphorylée lorsqu'elle ne co-localise pas avec StkP. On émet alors l'hypothèse que (i) au cours de la division cellulaire, une synthèse *de novo* suffisante permettrait à des nouvelles molécules de MapZ de remplacer les molécules de MapZ ayant été phosphorylées initialement par StkP et/ou que (ii) MapZ est déphosphorylée par la phosphatase PhpP dès qu'elle s'éloigne du site actif de division où se trouve StkP. PhpP est une protéine cytoplasmique enrichie au centre de la cellule (Beilharz et al., 2012 ; Ulrych et al., 2016). Il a également été montré que PhpP catalyse directement la déphosphorylation de MapZ (Ulrych et al., 2016). PhpP pourrait donc déphosphoryler MapZ dès le début de l'allongement de la cellule, lorsqu'elle s'éloigne de StkP. PhpP est majoritairement enrichie au centre de la cellule pendant la phase exponentielle de croissance mais pas en phase stationnaire (Beilharz et al., 2012), on peut alors se questionner sur la temporalité de la localisation de PhpP au cours du cycle cellulaire. On pourrait imaginer des expériences de co-localisation de PhpP et MapZ pour comparer



leur localisation aux différents stades d'avancement de la division cellulaire afin de déterminer leur proximité géographique. Cela nous permettrait de déterminer si PhpP est proche de MapZ au début de la division cellulaire et si elle pourrait déphosphoryler MapZ avant que cette dernière ne s'éloigne du septum.

Cependant, il est également possible que le niveau de phosphorylation de MapZ ne soit pas uniquement régulé par l'action des kinase/phosphatase StkP/PhpP mais aussi par un renouvellement de protéines MapZ synthétisées au cours du cycle cellulaire. On sait en effet que les gènes codants pour les protéines du divisome sont exprimés tout au long du cycle cellulaire. On pourrait envisager de répondre à cette question avec une expérience de microscopie à épifluorescence, en fusionnant la protéine MapZ avec une protéine fluorescente photoconvertible (Gurskaya NG, et al., 2006 ; Chudakov et al., 2007 ; McKinney et al., 2009). En suivant la croissance de bactéries au début de la division cellulaire en *time lapse*, une première capture de la fluorescence (de longueur d'onde d'émission A) permettrait de déterminer la localisation de MapZ initiale. Ensuite, la protéine fluorescente pourra être photoconvertie pour émettre à une longueur d'onde B. Ainsi, la localisation de MapZ pourra être suivie en mesurant la fluorescence de la protéine à la longueur d'onde initiale (A) et photoconvertie (B). De cette façon, on distinguera les protéines MapZ issues de la synthèse *de novo* (émettant à la longueur d'onde A) des protéines MapZ initialement présentes au début du cycle cellulaire (émettant à la longueur d'onde B). Suivie en temps réel, cette expérience nous permettrait de déterminer la vitesse de recyclage des molécules de MapZ. On pourrait ainsi déterminer s'il y a un renouvellement des protéines MapZ au cours d'un cycle de division cellulaire.

- Quelle est la pertinence biologique de la phosphorylation de MapZ ?

Les expériences de microscopie en TIRF ont montré que EzrA ne se relocalise pas correctement aux futurs sites de division cellulaire dans un mutant *mapZ-2TE*, un phénotype similaire à celui observé dans un mutant  $\Delta mapZ$  (Figure 47). Dans ces mutants, EzrA se distribue de façon aberrante aux futurs sites de division grâce à un mécanisme de compensation (*failsafe mechanism* en anglais) déjà observé précédemment dans une autre souche de *S. pneumoniae* (Perez et al., 2019, 2021a). Ce mécanisme de compensation se caractérise par la diffusion (*streaming* en anglais) des molécules de EzrA dans la membrane



cellulaire, résultant en des anneaux qui ne sont pas perpendiculaires à l'axe longitudinal de la cellule mais qui forment plutôt des hélices distribuées dans la cellule (Perez et al., 2019). Dans ces mutants où MapZ est dysfonctionnelle ou absente, la polymérisation de FtsZ et de EzrA aux sites de division serait perturbée et cela conduirait à une localisation aberrante et une instabilité de l'anneau Z. En effet, des études ont suggéré que les anneaux de MapZ agiraient comme des « circuits » facilitant la polymérisation et le *treadmilling* de FtsZ et de EzrA (Li et al., 2018 ; Feng et al., 2019 ; Perez et al., 2019, 2021a).

Contrairement à ce qui a été observé dans le mutant phosphoablatif *mapZ-2TE*, le mutant phosphomimétique *mapZ-2TA* présente une dynamique de EzrA similaire à la souche sauvage. On peut alors se demander pourquoi la phosphorylation de MapZ est importante pour la cellule ? En effet, on sait que l'équilibre entre la forme phosphorylée et déphosphorylée de MapZ est essentiel à la morphologie et à la division du pneumocoque (Fleurie et al., 2014). D'un autre côté, les expériences réalisées en TIRF montrent que EzrA est capable de se localiser normalement dans une souche où MapZ est déphosphorylée de façon permanente. Cette observation pourrait s'expliquer par la différence de milieu de culture utilisé, puisque du milieu C+Y a été utilisé dans cette étude alors que du THY avait été utilisé dans l'étude précédente (Fleurie et al., 2014). Le milieu C+Y est un milieu moins riche que le milieu THY, il est donc possible que le THY contienne plus de composés pouvant générer un stress pour la cellule. La phosphorylation constitutive de MapZ ne semblait pas causer de défauts majeurs dans nos conditions d'observation, mais elle pourrait s'avérer délétère dans d'autres conditions. Par exemple, la phosphorylation de MapZ pourrait s'avérer indispensable dans d'autres souches de *S. pneumoniae*. La souche utilisée dans notre étude est la souche de laboratoire R6. Des mutations dans certains gènes de cette souche pourraient compenser l'effet délétère de la déphosphorylation constitutive de MapZ. Au contraire, cette déphosphorylation permanente pourrait par exemple s'avérer toxique dans la souche D39, qui présente de nombreuses différences génétiques par rapport à R6. Enfin, la phosphorylation de MapZ pourrait s'avérer indispensable en conditions d'infection. On pourrait par exemple étudier l'effet de la phosphorylation de MapZ dans la souche pathogène TIGR4, dont la paroi cellulaire est décorée par des pili, indispensables pour la virulence du pneumocoque (Mosochioni et al., 2008). On pourrait imaginer que l'équilibre entre les formes phosphorylée et déphosphorylée de MapZ soit important pour la formation



des pili, et notamment pour la régulation des pilines impliquées dans leur assemblage (Barocchi et al., 2006).

- Peut-on raffiner les domaines d'interaction des protéines ?

Les tests d'interaction par résonance plasmonique de surface ont permis de déterminer que plusieurs ou tous les domaines spectrine de EzrA sont capables d'interagir avec MapZ, sans exclure que le domaine C-terminal de EzrA puisse également interagir. En revanche, on peut noter que bien que les domaines spectrines ne présentent aucune homologie de séquence entre eux, leur structure secondaire et tertiaire est très similaire (Cleverley et al., 2014). MapZ serait donc capable d'interagir avec les domaines spectrine en général, sans reconnaître une séquence en particulier. Il n'est pas exclu que MapZ puisse reconnaître certains motifs dans les domaines spectrines, qui pourraient par exemple être orientés de façon à pouvoir interagir avec le domaine cytoplasmique de MapZ. L'expérience nous a permis de conclure que deux domaines spectrine sont suffisants à l'interaction et que l'ajout d'un troisième domaine ne change pas la constante d'affinité (KD). Afin de déterminer si un seul domaine spectrine est suffisant pour l'interaction, nous avons tenté de produire un domaine spectrine unique (le domaine S3). Malheureusement, produire un seul domaine spectrine n'est pas stable et nous n'avons pas pu réaliser la mesure de l'interaction. Pour stabiliser le domaine à produire, nous pourrions le rallonger en ajoutant une partie du domaine spectrine précédent et une partie du suivant (les hélices alpha adjacentes par exemple). Si cette technique fonctionne, nous pourrions produire les domaines spectrine centraux (S2, S3 et S4) et comparer leurs constantes d'affinité pour l'interaction avec MapZ<sub>Cyto</sub>-2TA.

Le domaine cytoplasmique de MapZ est intrinsèquement désordonné (Hosek et al., 2020). On peut imaginer qu'il puisse se structurer lors de son interaction avec EzrA. Des expériences de co-cristallisation pourraient être réalisées en purifiant le domaine cytoplasmique de MapZ avec un ou deux domaines spectrine de EzrA. On pourrait ainsi déterminer la structure des domaines en interaction.

Les expériences de POLAR et de double hybride bactérien nous ont permis de montrer que l'interaction entre EzrA et MapZ est directe. On sait que MapZ interagit également avec FtsZ



et avec la membrane plasmique (Fleurie et al., 2014 ; Hosek et al., 2020). EzrA interagit quant à elle avec FtsZ, GpsB et DivIVA (Fleurie et al., 2014). On peut alors se demander si ces interactions sont séquentielles ou bien s'il existe une compétition pour les interactions entre les protéines. EzrA possède un motif QNR conservé au niveau de l'extrémité C-terminale (résidus 512 à 518). Comme chez *B. subtilis*, le motif est important pour la localisation et la fonction de EzrA (Cleverley et al., 2014 ; Perez et al., 2022). Le motif QNR de *B. subtilis* pourrait directement interagir avec FtsZ (Land et al., 2014). Le modèle de positionnement chez *B. subtilis* propose que EzrA forme une arche dont l'extrémité C terminale serait proche de la membrane. Cette position exposerait les résidus du motif QNR vers l'intérieur de la membrane et permettrait leur interaction directe avec FtsZ (Cleverley et al., 2014). Si cette configuration est vraie pour *S. pneumoniae*, on pourrait donc imaginer que EzrA puisse interagir de façon concomitante avec FtsZ et MapZ, respectivement via son domaine C-terminal et ses domaines spectrine. De futures études pourraient permettre de déterminer la stœchiométrie de ces interactions et de mettre en évidence d'éventuels phénomènes de compétition entre ces différentes interactions.

- Ouvertures

MapZ est le seul substrat connu de StkP pour lequel il est aujourd'hui démontré que sa phosphorylation impacte son interaction avec un partenaire. Au contraire, la phosphorylation de MacP n'a pas d'impact sur son interaction avec PBP2a (Fenton et al., 2018). Quant aux autres substrats de StkP, DivIVA et EloR, l'impact éventuel de leur phosphorylation sur leurs interactions avec des partenaires reste inconnu. Dans la littérature, on retrouve peu d'exemples de protéines dont la localisation (ou celle de leur partenaire) est influencée par la phosphorylation. Par exemple, chez *Mycobacterium tuberculosis*, la protéine CwIM, substrat de la STPK PknB, présente une localisation différente selon son état de phosphorylation. CwIM est produite sous deux formes : (i) une forme déphosphorylée, associée à la membrane, qui interagit avec la flippase MurJ et (ii) une forme phosphorylée, cytoplasmique, qui interagit avec la protéine FhaA, connue pour interagir avec des protéines phosphorylées (Turapov et al., 2018). CwIM est décrite pour réguler la biosynthèse des précurseurs du peptidoglycane et leur transport à travers la membrane plasmique. Ainsi, l'équilibre entre ses formes phosphorylée et déphosphorylée pourrait être



nécessaire à la régulation de la biosynthèse de la paroi cellulaire. Un autre exemple concerne la protéine TmaR de *E. coli*. TmaR est la seule protéine connue pour réguler la localisation d'un partenaire par phosphorylation, bien qu'il soit envisageable que d'autres protéines possèdent le même mécanisme de régulation. TmaR est une protéine cytoplasmique qui se localise aux pôles de *E. coli* lorsqu'elle est phosphorylée sur une tyrosine. Lorsque TmaR est phosphorylée, elle interagit avec la protéine du système PTS EI et la séquestre aux pôles. Cette interaction diminue l'activité de EI, ce qui régule le transport des sucres (Szoke et al., 2020). Seule la forme phosphorylée de TmaR est capable de libérer EI pour lui permettre d'être active, puisque la forme déphosphorylée interagit de manière irréversible. Les amas polaires servent donc de réservoir aux protéines EI « prêtes à l'emploi ». TmaR agit donc comme un régulateur spatial du métabolisme des sucres en utilisant un système de séquestration/libération des enzymes du PTS.

Ces deux exemples illustrent que l'interaction entre les protéines peut être modulée en fonction de l'état de phosphorylation d'un de leurs partenaires et montrent que l'équilibre entre les formes phosphorylées et déphosphorylées des protéines semble jouer un rôle crucial dans la régulation de processus biologiques. À l'avenir, il serait intéressant d'explorer ce type de mécanisme d'interaction pour d'autres protéines et dans d'autres modèles bactériens.

En conclusion, la phosphorylation de MapZ permet de réguler la localisation de EzrA au cours du cycle cellulaire. MapZ agirait comme un interrupteur moléculaire qui permettrait un niveau de régulation supplémentaire pour la mise en place du site de division cellulaire. De futures études permettront de mettre en évidence le mécanisme de régulation sous-jacent de l'interaction.



## Partie II – Caractérisation de la protéine de morphogénèse CopD et rôle dans la division cellulaire de *Streptococcus pneumoniae*

Mon deuxième projet de thèse portait sur l'identification d'une nouvelle protéine de morphogénèse chez le pneumocoque, appelée CopD. Nous avons montré que la délétion du gène *copD* conduit à une augmentation de la largeur des cellules, sans modification de leur longueur. CopD, homologue à la protéine TseB chez *B. subtilis*, est la première protéine régulatrice identifiée d'une PBP de classe B. CopD est composée d'un court domaine cytoplasmique, d'un unique segment transmembranaire et d'un domaine extracellulaire composé de deux domaines PepSY dont la fonction est inconnue.

- Quel est le rôle des domaines PepSY de CopD ?

Les domaines PepSY sont constitués de quatre brins  $\beta$  antiparallèles et d'une hélice  $\alpha$ , un repliement qui appartient à la superfamille des protéines ressemblant aux BLIP ( $\beta$ -lactamase inhibitor protein) (Das et al., 2010). Les fonctions de ces protéines restent inconnues, mais certaines d'entre elles sont impliquées dans la maintenance de l'intégrité de la paroi cellulaire (Gyun et al., 2000 ; Ochsner et al., 1999 ; Sklar et al., 2007). Bien que leur rôle ne soit pas totalement élucidé, les domaines PepSY ont également été décrits comme des régulateurs de glycosylases et de peptidases extracellulaires. Ils pourraient inhiber l'activité peptidase de ces enzymes avant leur libération dans l'environnement (Yeats et al., 2004). De plus, ils sont retrouvés dans d'autres protéines qui n'ont pas d'activité peptidase extracellulaire.

Les domaines PepSY de CopD ne sont pas responsables de l'interaction entre CopD et les PBPs. Cependant, ils pourraient être responsables de l'interaction de CopD avec d'autres partenaires ou exercer une fonction de régulation. Pour identifier de nouveaux partenaires de CopD, une approche de co-immunoprécipitation des protéines couplée à une analyse en spectrométrie de masse LC-MS/MS pourrait être utilisée. Pour détecter des partenaires dont l'interaction est médiée par les domaines PepSY, on pourrait comparer une souche sauvage avec une souche dans laquelle le domaine extracellulaire de *copD* a été supprimé (*copD $\Delta$ PepSY*). De futures études permettront de répondre à ces questions.

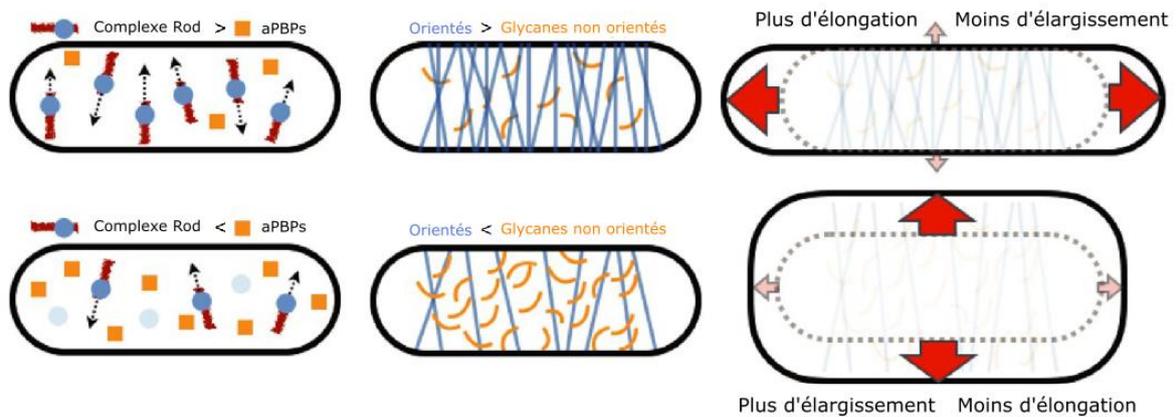


Figure 49 : Modèle de la régulation de la largeur cellulaire par le système Rod et les PBPs de classe A. Lorsque l'activité de complexe Rod est élevée par rapport à celle des aPBPs, les sacculi contiennent davantage de matériau orienté circonférentiellement (panel du haut). Au contraire, lorsque l'activité de complexe Rod est moins importante que celle des aPBPs, les sacculi contiennent davantage de matériau non orientés (panel du bas). À mesure que la quantité de matériau orienté augmente, les sacculi deviennent plus rigides dans leur largeur, mais moins rigides dans leur longueur. Ainsi, soumis à la pression turgescence interne, les sacculi avec une activité Rod plus élevée maintiennent leur largeur cellulaire et s'étirent dans leur longueur (en haut à droite). En revanche, les cellules avec une activité Rod réduite ont moins de glycanes orientés circonférentiellement et s'étirent donc davantage dans leur largeur (en bas à droite). D'après (Dion et al., 2019).

- Quel est l'impact de CopD sur la morphogénèse du pneumocoque ?

La nouveauté de cette étude repose sur le phénotype du mutant  $\Delta copD$ . En effet, on connaît de nombreuses protéines qui ont un rôle dans l'élongation (PBP2b/RodA, PBP1a) ou la septation (PBP2x/FtsW, PBP2a) des cellules du pneumocoque (Briggs et al., 2021). Dans le cas de mutants où la délétion de ces protéines entraîne une modification de la largeur cellulaire, cela s'accompagne généralement d'une modification de la longueur cellulaire. C'est le cas de mutants de déplétion de PBP2x ou encore GpsB, qui présentent des cellules élargies et allongées (Tsui et al., 2014, Philippe et al., 2014 ; Land et al., 2013 ; Berg et al., 2013). Par conséquent, il est intéressant de comprendre pourquoi la délétion de *copD* affecte uniquement la largeur cellulaire sans avoir d'incidence sur la longueur cellulaire. À cet égard, plusieurs hypothèses ont été envisagées et sont exposées ci-dessous.

D'une part, une étude chez *B. subtilis* a montré que le complexe Rod (composé de RodA/PBP2a, MreBCD et RodZ) renforce la résistance de la cellule à la pression de turgescence en produisant du peptidoglycane orienté (Dion et al., 2019). Orienté par les filaments de MreB, le complexe Rod a un mouvement circonférentiel autour de la cellule. Les filaments de MreB orientés perpendiculairement à l'axe longitudinal de la cellule guident la pression de turgescence vers les pôles de la cellule. Cela conduit à une croissance de la cellule en longueur plutôt qu'en largeur et ainsi réduit le diamètre du sacculus (Garner et al., 2011 ; van Teeffelen et al., 2011 ; Domingez-Escobar et al., 2011). Au contraire, les PBPs de classe A n'ont pas de mouvement circonférentiel et insèrent le peptidoglycane de manière isotropique. La pression de turgescence n'est donc pas contrainte au niveau des pôles cellulaires et s'exerce sur toute la largeur de la cellule. Cela résulte en l'élargissement du sacculus (Dion et al., 2019) (Figure 49). Le système Rod et les PBPs de classe A auraient donc un effet opposé, où le complexe Rod évoluant circonférentiellement réduit le diamètre cellulaire alors que les aPBPs au mouvement isotropique augmente le diamètre cellulaire. De plus, la surexpression de RodA augmente le diamètre cellulaire, mais seulement quand la synthèse de PBP2a est suffisamment forte (Dion et al., 2019). Ainsi, l'équilibre entre ces deux systèmes serait essentiel pour réguler la largeur cellulaire. Chez le pneumocoque, ce pourrait être l'équilibre entre les PBPs de classe A et le système d'élongation RodA/PBP2b qui serait responsable de l'élargissement cellulaire. Ainsi, en l'absence de CopD,



la persistance de PBP1a et PBP2b au septum de division perturberait cet équilibre et entraînerait un élargissement cellulaire.

D'autre part, des travaux récents ont mis en évidence que la synthèse du peptidoglycane repose sur un mécanisme à deux vitesses. Ce processus implique l'incorporation continue de peptidoglycane issu de la synthèse septale, qui est ensuite dégradé par des hydrolases de la paroi cellulaire, tout en étant complété par du peptidoglycane issu de la synthèse périphérique (Trouve et al., 2021). PBP1a et PBP2b sont deux PBPs impliquées dans l'élongation cellulaire, participant à la synthèse périphérique du peptidoglycane (Land et al., 2011 ; Perez et al., 2021). En conséquence, la persistance de PBP1a et de PBP2b au site actif de division et le retard dans leur positionnement aux équateurs pourraient conduire à une synthèse excessive de peptidoglycane périphérique. Ce déséquilibre dans le ratio de synthèse entre le peptidoglycane périphérique et le peptidoglycane septal pourrait entraîner un décalage dans le processus de septation des cellules filles, entraînant ainsi un élargissement des cellules.

Finalement, le rôle de CopD est particulièrement intéressant, car il régule à la fois une PBP de classe A et de classe B. Une étude récente a mis en évidence une différence dans le peptidoglycane produit par les PBPs de classe A par rapport à celui produit par les PBPs de classe B, le premier étant résistant à l'hydrolase CbpD (Straume et al., 2020). Les PBPs de classe A pourraient donc être impliquées dans le remodelage et la réparation du peptidoglycane, tandis que les PBPs de classe B et les protéines SEDS seraient responsables de la synthèse du peptidoglycane primaire (Straume et al., 2020). Ces observations sont étayées par des études de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif. Des observations en microscopie à force atomique ont en effet montré la présence de deux couches de peptidoglycane, une orientée de manière aléatoire, du côté intracellulaire et une orientée de manière concentrique, du côté extracellulaire (Pasquina-Lemonche et al., 2020). Ces différences d'architecture de la paroi cellulaire pourraient être expliquées par les fonctions distinctes des PBPs de classe A et B. Ainsi, CopD semble agir à la fois sur la synthèse primaire du peptidoglycane et sur son remodelage, en régulant les fonctions de PBP2b et de PBP1a.



- Quel est l'impact de l'absence de CopD sur la composition et structure du peptidoglycane ?

Chez *B. subtilis*, des images de microscopie électronique à transmission ont montré que la surproduction de PBP2A (homologue à PBP2b<sub>spn</sub>) dans une souche délétée du gène codant pour TseB, l'homologue de CopD, entraînait d'importants défauts de la paroi cellulaire. En particulier, la couche de peptidoglycane est plus épaisse et plus hétérogène, surtout aux pôles cellulaires (Delisle et al., 2021). Il serait donc intéressant d'observer l'aspect de la paroi cellulaire de mutants  $\Delta copD$  chez *S. pneumoniae*, afin d'évaluer l'impact de l'absence de ce régulateur sur l'organisation du peptidoglycane. Ces observations en microscopie électronique pourraient s'accompagner de l'analyse de la composition du peptidoglycane en spectrométrie de masse LC-MS/MS, en comparaison avec une souche sauvage.

En conclusion, cette étude contribue à une meilleure compréhension du rôle des régulateurs des synthèses du peptidoglycane. Cela permettra, à terme, d'avoir une vision plus globale de l'ensemble des régulateurs de PBPs, en identifiant les possibles interactions entre ces derniers. D'autres études permettront également de déterminer s'il existe d'autres régulateurs de PBPs non identifiés et si les régulateurs déjà connus ont des fonctions plus étendues que celles qui leur sont attribuées.



# Références bibliographiques

Abdullahi, O., Karani, A., Tigoi, C. C., Mugo, D., Kungu, S., Wanjiru, E., Jomo, J., Musyimi, R., Lipsitch, M., & Scott, J. A. G. (2012). The Prevalence and Risk Factors for Pneumococcal Colonization of the Nasopharynx among Children in Kilifi District, Kenya. *PLoS ONE*, *7*(2), e30787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030787>

Adams, D. W., & Errington, J. (2009). Bacterial cell division : Assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature Reviews Microbiology*, *7*(9), 642-653. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2198>

Alcorlo, M., Straume, D., Lutkenhaus, J., Håvarstein, L. S., & Hermoso, J. A. (2020). Structural Characterization of the Essential Cell Division Protein FtsE and Its Interaction with FtsX in *Streptococcus pneumoniae*. *MBio*, *11*(5), e01488-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01488-20>

Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2016). ConSurf 2016 : An improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W344-W350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw408>

Abdullahi, O., Karani, A., Tigoi, C. C., Mugo, D., Kungu, S., Wanjiru, E., Jomo, J., Musyimi, R., Lipsitch, M., & Scott, J. A. G. (2012). The Prevalence and Risk Factors for Pneumococcal Colonization of the Nasopharynx among Children in Kilifi District, Kenya. *PLoS ONE*, *7*(2), e30787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030787>

Adams, D. W., & Errington, J. (2009). Bacterial cell division : Assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature Reviews Microbiology*, *7*(9), 642-653. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2198>

Alcorlo, M., Straume, D., Lutkenhaus, J., Håvarstein, L. S., & Hermoso, J. A. (2020). Structural Characterization of the Essential Cell Division Protein FtsE and Its Interaction with FtsX in *Streptococcus pneumoniae*. *MBio*, *11*(5), e01488-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01488-20>

Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2016). ConSurf 2016 : An improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W344-W350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw408>

Aussel, L., Barre, F.-X., Aroyo, M., Stasiak, A., Stasiak, A. Z., & Sherratt, D. (2002). FtsK Is a DNA Motor Protein that Activates Chromosome Dimer Resolution by Switching the Catalytic State of the XerC and XerD Recombinases. *Cell*, *108*(2), 195-205. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00624-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00624-4)

Babl, L., Merino-Salomón, A., Kanwa, N., & Schwille, P. (2022). Membrane mediated phase separation of the bacterial nucleoid occlusion protein Noc. *Scientific Reports*, *12*(1), 17949. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22680-5>

- Barcus, V. A., Ghanekar, K., Yeo, M., Coffey, T. J., & Dowson, C. G. (1995). Genetics of high level penicillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters*, *126*(3), 299-303. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07433.x>
- Battaje, R. R., Bhondwe, P., Dhaked, H. P. S., & Panda, D. (2021). Evidence of conformational switch in *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* FtsZ during polymerization. *Protein Science*, *30*(3), 523-530. <https://doi.org/10.1002/pro.4015>
- Beeby, M., Gumbart, J. C., Roux, B., & Jensen, G. J. (2013). Architecture and assembly of the Gram-positive cell wall: Gram-positive peptidoglycan structure. *Molecular Microbiology*, *88*(4), 664-672. <https://doi.org/10.1111/mmi.12203>
- Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W., & Götz, F. (2004). Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*: Lysozyme resistance of *S. aureus*. *Molecular Microbiology*, *55*(3), 778-787. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04446.x>
- Bernhardt, T. G., & De Boer, P. A. J. (2005). SlmA, a Nucleoid-Associated, FtsZ Binding Protein Required for Blocking Septal Ring Assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Molecular Cell*, *18*(5), 555-564. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.012>
- Bindels, D. S., Haarbosch, L., van Weeren, L., Postma, M., Wiese, K. E., Mastop, M., Aumonier, S., Gotthard, G., Royant, A., Hink, M. A., & Gadella, T. W. J. (2017). mScarlet: A bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nature Methods*, *14*(1), 53-56. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4074>
- Bisson-Filho, A. W., Hsu, Y.-P., Squyres, G. R., Kuru, E., Wu, F., Jukes, C., Sun, Y., Dekker, C., Holden, S., VanNieuwenhze, M. S., Brun, Y. V., & Garner, E. C. (2017). Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science*, *355*(6326), 739-743. <https://doi.org/10.1126/science.aak9973>
- Blencowe, D. K., Al Jubori, S., & Morby, A. P. (2011). Identification of a novel function for the FtsL cell division protein from *Escherichia coli* K12. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *411*(1), 44-49. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.083>
- Boes, A., Olatunji, S., Breukink, E., & Terrak, M. (2019). Regulation of the Peptidoglycan Polymerase Activity of PBP1b by Antagonist Actions of the Core Divisome Proteins FtsBLQ and FtsN. *MBio*, *10*(1), e01912-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01912-18>
- Bonnet, J., Durmort, C., Jacq, M., Mortier-Barrière, I., Campo, N., VanNieuwenhze, M. S., Brun, Y. V., Arthaud, C., Gallet, B., Moriscot, C., Morlot, C., Vernet, T., & Di Guilmi, A. M. (2017). Peptidoglycan O-acetylation is functionally related to cell wall biosynthesis and cell division in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, *106*(5), 832-846. <https://doi.org/10.1111/mmi.13849>

Bonnet, J., Wong, Y.-S., Vernet, T., Di Guilmi, A. M., Zapun, A., & Durmort, C. (2018). One-Pot Two-Step Metabolic Labeling of Teichoic Acids and Direct Labeling of Peptidoglycan Reveals Tight Coordination of Both Polymers Inserted into Pneumococcus Cell Wall. *ACS Chemical Biology*, *13*(8), 2010-2015. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00559>

Bowman, G. R., Comolli, L. R., Zhu, J., Eckart, M., Koenig, M., Downing, K. H., Moerner, W. E., Earnest, T., & Shapiro, L. (2008). A Polymeric Protein Anchors the Chromosomal Origin/ParB Complex at a Bacterial Cell Pole. *Cell*, *134*(6), 945-955. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.015>

Bramhill, D., & Thompson, C. M. (1994). GTP-dependent polymerization of Escherichia coli FtsZ protein to form tubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(13), 5813-5817. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.13.5813>

Bramkamp, M., Emmins, R., Weston, L., Donovan, C., Daniel, R. A., & Errington, J. (2008). A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. *Molecular Microbiology*, *70*(6), 1556-1569. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06501.x>

Bramkamp, M., & Van Baarle, S. (2009). Division site selection in rod-shaped bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, *12*(6), 683-688. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.10.002>

Briggs, N. S., Bruce, K. E., Naskar, S., Winkler, M. E., & Roper, D. I. (2021). The Pneumococcal Divisome: Dynamic Control of Streptococcus pneumoniae Cell Division. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 737396. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737396>

Briles, D. E., Paton, J. C., Mukerji, R., Swiatlo, E., & Crain, M. J. (2019). Pneumococcal Vaccines. *Microbiology Spectrum*, *7*(6), 7.6.2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0028-2018>

Brooks, L. R. K., & Mias, G. I. (2018). Streptococcus pneumoniae's Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1366. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01366>

Brown, A. O., Mann, B., Gao, G., Hankins, J. S., Humann, J., Giardina, J., Faverio, P., Restrepo, M. I., Halade, G. V., Mortensen, E. M., Lindsey, M. L., Hanes, M., Happel, K. I., Nelson, S., Bagby, G. J., Lorent, J. A., Cardinal, P., Granados, R., Esteban, A., ... Orihuela, C. J. (2014). Streptococcus pneumoniae Translocates into the Myocardium and Forms Unique Microlesions That Disrupt Cardiac Function. *PLoS Pathogens*, *10*(9), e1004383. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004383>

Busiek, K. K., & Margolin, W. (2015). Bacterial Actin and Tubulin Homologs in Cell Growth and Division. *Current Biology*, *25*(6), R243-R254. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.030>

Buske, P. J., Mittal, A., Pappu, R. V., & Levin, P. A. (2015). An intrinsically disordered linker plays a critical role in bacterial cell division. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *37*, 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.09.017>

- Cabré, E. J., Monterroso, B., Alfonso, C., Sánchez-Gorostiaga, A., Reija, B., Jiménez, M., Vicente, M., Zorrilla, S., & Rivas, G. (2015). The Nucleoid Occlusion SImA Protein Accelerates the Disassembly of the FtsZ Protein Polymers without Affecting Their GTPase Activity. *PLOS ONE*, *10*(5), e0126434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126434>
- Caldas, P., López-Pelegrín, M., Pearce, D. J. G., Budanur, N. B., Brugués, J., & Loose, M. (2019). Cooperative ordering of treadmilling filaments in cytoskeletal networks of FtsZ and its crosslinker ZapA. *Nature Communications*, *10*(1), 5744. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13702-4>
- Cassone, M., Gagne, A. L., Spruce, L. A., Seeholzer, S. H., & Sebert, M. E. (2012). The HtrA Protease from *Streptococcus pneumoniae* Digests Both Denatured Proteins and the Competence-stimulating Peptide. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(46), 38449-38459. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.391482>
- Chesnel, L., Carapito, R., Croize, J., Dideberg, O., Vernet, T., & Zapun, A. (2005). Identical Penicillin-Binding Domains in Penicillin-Binding Proteins of *Streptococcus pneumoniae* Clinical Isolates with Different Levels of  $\beta$ -Lactam Resistance. *ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER.*, *49*.
- Chudakov, D. M., Lukyanov, S., & Lukyanov, K. A. (2007). Tracking intracellular protein movements using photoswitchable fluorescent proteins PS-CFP2 and Dendra2. *Nature Protocols*, *2*(8), 2024-2032. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.291>
- Cleverley, R. M., Barrett, J. R., Baslé, A., Bui, N. K., Hewitt, L., Solovyova, A., Xu, Z.-Q., Daniel, R. A., Dixon, N. E., Harry, E. J., Oakley, A. J., Vollmer, W., & Lewis, R. J. (2014). Structure and function of a spectrin-like regulator of bacterial cytokinesis. *Nature Communications*, *5*(1), 5421. <https://doi.org/10.1038/ncomms6421>
- Cleverley, R. M., Rutter, Z. J., Rismondo, J., Corona, F., Tsui, H.-C. T., Alatawi, F. A., Daniel, R. A., Halbedel, S., Massidda, O., Winkler, M. E., & Lewis, R. J. (2019). The cell cycle regulator GpsB functions as cytosolic adaptor for multiple cell wall enzymes. *Nature Communications*, *10*(1), 261. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08056-2>
- Corrales-Guerrero, L., He, B., Refes, Y., Panis, G., Bange, G., Viollier, P. H., Steinchen, W., & Thanbichler, M. (2020). Molecular architecture of the DNA-binding sites of the P-loop ATPases MipZ and ParA from *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Research*, *48*(9), 4769-4779. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa192>
- Corrales-Guerrero, L., Steinchen, W., Ramm, B., Mücksch, J., Rosum, J., Refes, Y., Heimerl, T., Bange, G., Schulle, P., & Thanbichler, M. (2022). MipZ caps the plus-end of FtsZ polymers to promote their rapid disassembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(50), e2208227119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2208227119>

Cortes, P. R., Piñas, G. E., Cian, M. B., Yandar, N., & Echenique, J. (2015). Stress-triggered signaling affecting survival or suicide of *Streptococcus pneumoniae*. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(1), 157-169. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.12.002>

Crisóstomo, M. I., Vollmer, W., Kharat, A. S., Inhülsen, S., Gehre, F., Buckenmaier, S., & Tomasz, A. (2006). Attenuation of penicillin resistance in a peptidoglycan O<sup>6</sup>-acetyl transferase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 61(6), 1497-1509. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05340.x>

Daniel, R. A., & Errington, J. (s. d.). *Control of Cell Morphogenesis in Bacteria : Two Distinct Ways to Make a Rod-Shaped Cell*.

Das, D., Finn, R. D., Carlton, D., Miller, M. D., Abdubek, P., Astakhova, T., Axelrod, H. L., Bakolitsa, C., Chen, C., Chiu, H.-J., Chiu, M., Clayton, T., Deller, M. C., Duan, L., Ellrott, K., Ernst, D., Farr, C. L., Feuerhelm, J., Grant, J. C., ... Wilson, I. A. (2010). The structure of BVU2987 from *Bacteroides vulgatus* reveals a superfamily of bacterial periplasmic proteins with possible inhibitory function. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(10), 1265-1273. <https://doi.org/10.1107/S1744309109046788>

De Boer, P. A., Crossley, R. E., & Rothfield, L. I. (1992). Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174(1), 63-70. <https://doi.org/10.1128/jb.174.1.63-70.1992>

De Boer, P. A. J., Crossley, R. E., & Rothfield, L. I. (1989). A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. *Cell*, 56(4), 641-649. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90586-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90586-2)

Delisle, J., Cordier, B., Audebert, S., Pophillat, M., Cluzel, C., Espinosa, L., Grangeasse, C., Galinier, A., & Doan, T. (2021). Characterization of TseB : A new actor in cell wall elongation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 116(4), 1099-1112. <https://doi.org/10.1111/mmi.14798>

Dion, M. F., Kapoor, M., Sun, Y., Wilson, S., Ryan, J., Vigouroux, A., van Teeffelen, S., Oldenbourg, R., & Garner, E. C. (2019). *Bacillus subtilis* cell diameter is determined by the opposing actions of two distinct cell wall synthetic systems. *Nature Microbiology*, 4(8), 1294-1305. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0439-0>

Dockrell, D. H., & Brown, J. S. (2015). *Streptococcus pneumoniae* Interactions with Macrophages and Mechanisms of Immune Evasion. In *Streptococcus Pneumoniae* (p. 401-422). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410530-0.00021-1>

Domínguez-Escobar, J., Chastanet, A., Crevenna, A. H., Fromion, V., Wedlich-Söldner, R., & Carballido-López, R. (2011). Processive Movement of MreB-Associated Cell Wall Biosynthetic Complexes in Bacteria. *Science*, 333(6039), 225-228. <https://doi.org/10.1126/science.1203466>

Du, S., & Lutkenhaus, J. (2014). SlmA Antagonism of FtsZ Assembly Employs a Two-pronged Mechanism like MinCD. *PLoS Genetics*, *10*(7), e1004460. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004460>

Duman, R., Ishikawa, S., Celik, I., Strahl, H., Ogasawara, N., Troc, P., Löwe, J., & Hamoen, L. W. (2013). Structural and genetic analyses reveal the protein SepF as a new membrane anchor for the Z ring. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(48). <https://doi.org/10.1073/pnas.1313978110>

Ebersbach, G., Galli, E., Møller-Jensen, J., Löwe, J., & Gerdes, K. (2008). Novel coiled-coil cell division factor ZapB stimulates Z ring assembly and cell division. *Molecular Microbiology*, *68*(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06190.x>

Eldholm, V., Gutt, B., Johnsborg, O., Brückner, R., Maurer, P., Hakenbeck, R., Mascher, T., & Håvarstein, L. S. (2010). The Pneumococcal Cell Envelope Stress-Sensing System LiaFSR Is Activated by Murein Hydrolases and Lipid II-Interacting Antibiotics. *Journal of Bacteriology*, *192*(7), 1761-1773. <https://doi.org/10.1128/JB.01489-09>

El-Khoury, T., Nguyen, H.-A., Candusso, M.-P., Attieh, J., & Jault, J.-M. (2020). UbK is Involved in the Resistance of Bacillus Subtilis to Oxidative Stress. *Current Microbiology*, *77*(12), 4063-4071. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02239-1>

Ercoli, G., Fernandes, V. E., Chung, W. Y., Wanford, J. J., Thomson, S., Bayliss, C. D., Straatman, K., Crocker, P. R., Dennison, A., Martinez-Pomares, L., Andrew, P. W., Moxon, E. R., & Oggioni, M. R. (2018). Intracellular replication of Streptococcus pneumoniae inside splenic macrophages serves as a reservoir for septicemia. *Nature Microbiology*, *3*(5), 600-610. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0147-1>

Erickson, H. P. (1995). FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell*, *80*(3), 367-370. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90486-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90486-7)

Erickson, H. P., Anderson, D. E., & Osawa, M. (2010). FtsZ in Bacterial Cytokinesis : Cytoskeleton and Force Generator All in One. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(4), 504-528. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00021-10>

Errington, J., Daniel, R. A., & Scheffers, D.-J. (2003). Cytokinesis in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(1), 52-65. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.52-65.2003>

Eswaramoorthy, P., Erb, M. L., Gregory, J. A., Silverman, J., Pogliano, K., Pogliano, J., & Ramamurthi, K. S. (2011). Cellular Architecture Mediates DivIVA Ultrastructure and Regulates Min Activity in Bacillus subtilis. *MBio*, *2*(6), e00257-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00257-11>

Fadda, D., Pischedda, C., Caldara, F., Whalen, M. B., Anderluzzi, D., Domenici, E., & Massidda, O. (2003). Characterization of divIVA and Other Genes Located in the Chromosomal Region

Downstream of the *dcw* Cluster in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 185(20), 6209-6214. <https://doi.org/10.1128/JB.185.20.6209-6214.2003>

Fadda, D., Santona, A., D'Ulisse, V., Ghelardini, P., Ennas, M. G., Whalen, M. B., & Massidda, O. (2007). *Streptococcus pneumoniae* DivIVA : Localization and Interactions in a MinCD-Free Context. *Journal of Bacteriology*, 189(4), 1288-1298. <https://doi.org/10.1128/JB.01168-06>

Feikin, D. R., Hammitt, L. L., Murdoch, D. R., O'Brien, K. L., & Scott, J. A. G. (2017). The Enduring Challenge of Determining Pneumonia Etiology in Children : Considerations for Future Research Priorities. *Clinical Infectious Diseases*, 64(suppl\_3), S188-S196. <https://doi.org/10.1093/cid/cix143>

Feldman, C., & Anderson, R. (2019). Meningococcal pneumonia : A review. *Pneumonia*, 11(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s41479-019-0062-0>

Fenton, A. K., El Mortaji, L., Lau, D. T. C., Rudner, D. Z., & Bernhardt, T. G. (2016). CozE is a member of the MreCD complex that directs cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Microbiology*, 2(3), 16237. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.237>

Fenton, A. K., Manuse, S., Flores-Kim, J., Garcia, P. S., Mercy, C., Grangeasse, C., Bernhardt, T. G., & Rudner, D. Z. (2018). Phosphorylation-dependent activation of the cell wall synthase PBP2a in *Streptococcus pneumoniae* by MacP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(11), 2812-2817. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715218115>

Filipe, S. R., Pinho, M. G., & Tomasz, A. (2000). Characterization of the murMN Operon Involved in the Synthesis of Branched Peptidoglycan Peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 27768-27774. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004675200>

Fleurie, A., Lesterlin, C., Manuse, S., Zhao, C., Cluzel, C., Lavergne, J.-P., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Combet, C., Kuru, E., VanNieuwenhze, M. S., Brun, Y. V., Sherratt, D., & Grangeasse, C. (2014). MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature*, 516(7530), 259-262. <https://doi.org/10.1038/nature13966>

Fleurie, A., Manuse, S., Zhao, C., Campo, N., Cluzel, C., Lavergne, J.-P., Freton, C., Combet, C., Guiral, S., Soufi, B., Macek, B., Kuru, E., VanNieuwenhze, M. S., Brun, Y. V., Di Guilmi, A.-M., Claverys, J.-P., Galinier, A., & Grangeasse, C. (2014). Interplay of the Serine/Threonine-Kinase StkP and the Paralogs DivIVA and GpsB in Pneumococcal Cell Elongation and Division. *PLoS Genetics*, 10(4), e1004275. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004275>

Gallay, C., Sanselicio, S., Anderson, M. E., Soh, Y. M., Liu, X., Stamsås, G. A., Pellicciari, S., van Raaphorst, R., Dénéreáz, J., Kjos, M., Murray, H., Gruber, S., Grossman, A. D., & Veening, J.-W. (2021). CcrZ is a pneumococcal spatiotemporal cell cycle regulator that interacts with FtsZ and controls DNA replication by modulating the activity of DnaA. *Nature Microbiology*, 6(9), 1175-1187. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00949-1>

- Galli, E., & Gerdes, K. (2012). FtsZ-ZapA-ZapB Interactome of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 194(2), 292-302. <https://doi.org/10.1128/JB.05821-11>
- Garcia, P., Gonzalez, M. P., Garcia, E., Garcia, J. L., & Lopez, R. (1999). The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of Streptococcus pneumoniae reveals evolutionary mobile domains. *Molecular Microbiology*, 33(1), 128-138. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01455.x>
- Garner, E. C., Bernard, R., Wang, W., Zhuang, X., Rudner, D. Z., & Mitchison, T. (2011). Coupled, Circumferential Motions of the Cell Wall Synthesis Machinery and MreB Filaments in *B. subtilis*. *Science*, 333(6039), 222-225. <https://doi.org/10.1126/science.1203285>
- Geno, K. A., Gilbert, G. L., Song, J. Y., Skovsted, I. C., Klugman, K. P., Jones, C., Konradsen, H. B., & Nahm, M. H. (2015). Pneumococcal Capsules and Their Types : Past, Present, and Future. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 871-899. <https://doi.org/10.1128/CMR.00024-15>
- Gladstone, R. A., Jefferies, J. M., Tocheva, A. S., Beard, K. R., Garley, D., Chong, W. W., Bentley, S. D., Faust, S. N., & Clarke, S. C. (2015). Five winters of pneumococcal serotype replacement in UK carriage following PCV introduction. *Vaccine*, 33(17), 2015-2021. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.012>
- Goebel, W. F., Beeson, P. B., & Hoagland, C. L. (1939). CHEMO-IMMUNOLOGICAL STUDIES ON THE SOLUBLE SPECIFIC SUBSTANCE OF PNEUMOCOCCUS. *Journal of Biological Chemistry*, 129(2), 455-464. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)73609-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)73609-0)
- Goehring, N. W., & Beckwith, J. (2005). Diverse Paths to Midcell : Assembly of the Bacterial Cell Division Machinery. *Current Biology*, 15(13), R514-R526. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.038>
- Guiral, S., Mitchell, T. J., Martin, B., & Claverys, J.-P. (2005). Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae* : Genetic requirements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(24), 8710-8715. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500879102>
- Gurskaya, N. G., Verkhusha, V. V., Shcheglov, A. S., Staroverov, D. B., Chepurnykh, T. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, S., & Lukyanov, K. A. (2006). Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nature Biotechnology*, 24(4), 461-465. <https://doi.org/10.1038/nbt1191>
- Gutu, A. D., Wayne, K. J., Sham, L.-T., & Winkler, M. E. (2010). Kinetic Characterization of the WalRK<sub>spn</sub> (VicRK) Two-Component System of *Streptococcus pneumoniae* : Dependence of WalK<sub>spn</sub> (VicK) Phosphatase Activity on Its PAS Domain. *Journal of Bacteriology*, 192(9), 2346-2358. <https://doi.org/10.1128/JB.01690-09>

Guzman, L.-M., Barondess, J. J., & Beckwith, J. (s. d.). *FtsL, an Essential Cytoplasmic Membrane Protein Involved in Cell Division in Escherichia coli*.

Gyun Kang, S., Ung Park, H., Sook Lee, H., Tae Kim, H., & Joon Lee, K. (2000). New  $\beta$ -Lactamase Inhibitory Protein (BLIP-I) from *Streptomyces exfoliatus* SMF19 and Its Roles on the Morphological Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 16851-16856. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000227200>

Haenni, M., Lupo, A., & Madec, J.-Y. (2018). Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp. *Microbiology Spectrum*, 6(2), 6.2.09. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0008-2017>

Haeusser, D. P., Garza, A. C., Buscher, A. Z., & Levin, P. A. (2007). The Division Inhibitor EzrA Contains a Seven-Residue Patch Required for Maintaining the Dynamic Nature of the Medial FtsZ Ring. *Journal of Bacteriology*, 189(24), 9001-9010. <https://doi.org/10.1128/JB.01172-07>

Haeusser, D. P., & Levin, P. A. (2008). The great divide : Coordinating cell cycle events during bacterial growth and division. *Current Opinion in Microbiology*, 11(2), 94-99. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.008>

Haeusser, D. P., Schwartz, R. L., Smith, A. M., Oates, M. E., & Levin, P. A. (2004). EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ : EzrA inhibits FtsZ assembly through direct interactions. *Molecular Microbiology*, 52(3), 801-814. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04016.x>

Hakenbeck, R., Brückner, R., Denapaite, D., & Maurer, P. (2012, mars 6). *Molecular mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in Streptococcus pneumoniae* (London, UK). <https://doi.org/10.2217/Fmb.12.2>; Future Medicine Ltd London, UK. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.2>

Halbedel, S., & Lewis, R. J. (2019). Structural basis for interaction of DivIVA/GpsB proteins with their ligands. *Molecular Microbiology*, 111(6), 1404-1415. <https://doi.org/10.1111/mmi.14244>

Hamoen, L., Meile, J.-C., de Jong, W., Noirot, P., & Errington, J. (2006). SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. *Molecular Microbiology*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2958.2005.04987.x>

Haoran, A., Chenyun, Q., Yijia, H., JIng, L., Tian, X., Feng, J., Hu, J., Fang, Y., Jiao, F., Zeng, Y., Huang, X., Meng, X., Liu, X., Lin, X., Zeng, Z., Guilliams, M., Beschin, A., Chen, Y., Wu, Y., ... Zhang, J.-R. (2022). Functional vulnerability of liver macrophages to capsules defines virulence of blood-borne bacteria. *Journal of Experimental Medicine*, 219(4), e20212032. <https://doi.org/10.1084/jem.20212032>

Hardt, P., Engels, I., Rausch, M., Gajdiss, M., Ulm, H., Sass, P., Ohlsen, K., Sahl, H.-G., Bierbaum, G., Schneider, T., & Grein, F. (2017). The cell wall precursor lipid II acts as a

molecular signal for the Ser/Thr kinase PknB of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.12.001>

Haute Autorité de Santé. (2023). *Calendrier vaccinal 2023*. [https://sante.gouv.fr/IMG/pdf/calendrier\\_vaccinal\\_maj-juin23.pdf](https://sante.gouv.fr/IMG/pdf/calendrier_vaccinal_maj-juin23.pdf)

Håvarstein, L. S., Coomaraswamy, G., & Morrison, D. A. (1995). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(24), 11140-11144. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.11140>

Hempel, A. M., Cantlay, S., Molle, V., Wang, S.-B., Naldrett, M. J., Parker, J. L., Richards, D. M., Jung, Y.-G., Buttner, M. J., & Flärdh, K. (2012). The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria *Streptomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(35). <https://doi.org/10.1073/pnas.1207409109>

Hirst, R. A., Kadioglu, A., O'Callaghan, C., & Andrew, P. W. (2004). The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 138(2), 195-201. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02611.x>

Holečková, N., Doubravová, L., Massidda, O., Molle, V., Buriánková, K., Benada, O., Kofroňová, O., Ulrych, A., & Branny, P. (2015). LocZ Is a New Cell Division Protein Involved in Proper Septum Placement in *Streptococcus pneumoniae*. *MBio*, 6(1), e01700-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01700-14>

Hosek, T., Bougault, C. M., Lavergne, J.-P., Martinez, D., Ayala, I., Fenel, D., Restelli, M., Morlot, C., Habenstein, B., Grangeasse, C., & Simorre, J.-P. (2020). Structural features of the interaction of MapZ with FtsZ and membranes in *Streptococcus pneumoniae*. *Scientific Reports*, 10(1), 4051. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61036-9>

Hu, Z., & Lutkenhaus, J. (1999). Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE. *Molecular Microbiology*, 34(1), 82-90. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01575.x>

Ibrahim, Y. M., Kerr, A. R., McCluskey, J., & Mitchell, T. J. (2004). Control of Virulence by the Two-Component System CiaR/H Is Mediated via HtrA, a Major Virulence Factor of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 186(16), 5258-5266. <https://doi.org/10.1128/JB.186.16.5258-5266.2004>

Infante, A. J., McCullers, J. A., & Orihuela, C. J. (2015). Mechanisms of Predisposition to Pneumonia. In *Streptococcus Pneumoniae* (p. 363-382). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410530-0.00019-3>

Jacq, M., Adam, V., Bourgeois, D., Moriscot, C., Di Guilmi, A.-M., Vernet, T., & Morlot, C. (2015). Remodeling of the Z-Ring Nanostructure during the *Streptococcus pneumoniae* Cell

Cycle Revealed by Photoactivated Localization Microscopy. *MBio*, 6(4), e01108-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01108-15>

Jani, C., Eoh, H., Lee, J. J., Hamasha, K., Sahana, M. B., Han, J.-S., Nyayapathy, S., Lee, J.-Y., Suh, J.-W., Lee, S. H., Rehse, S. J., Crick, D. C., & Kang, C.-M. (2010). Regulation of Polar Peptidoglycan Biosynthesis by Wag31 Phosphorylation in Mycobacteria. *BMC Microbiology*, 10(1), 327. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-327>

Jean, N. L., Rutherford, T. J., & Löwe, J. (2020). FtsK in motion reveals its mechanism for double-stranded DNA translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(25), 14202-14208. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001324117>

Jedrzejewski, M. J. (2001). Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 187-207. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.187-207.2001>

Johnsborg, O., & Håvarstein, L. S. (2009). Pneumococcal LytR, a Protein from the LytR-CpsA-Psr Family, Is Essential for Normal Septum Formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 191(18), 5859-5864. <https://doi.org/10.1128/JB.00724-09>

Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C., & Andrew, P. W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 288-301. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1871>

Kang, C.-M., Abbott, D. W., Park, S. T., Dascher, C. C., Cantley, L. C., & Husson, R. N. (2005). The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: Substrate identification and regulation of cell shape. *Genes & Development*, 19(14), 1692-1704. <https://doi.org/10.1101/gad.1311105>

Kaur, P., Rausch, M., Malakar, B., Watson, U., Damle, N. P., Chawla, Y., Srinivasan, S., Sharma, K., Schneider, T., Jhingan, G. D., Saini, D., Mohanty, D., Grein, F., & Nandicoori, V. K. (2019). LipidII interaction with specific residues of *Mycobacterium tuberculosis* PknB extracytoplasmic domain governs its optimal activation. *Nature Communications*, 10(1), 1231. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09223-9>

Keech, C. A., Morrison, R., Anderson, P., Tate, A., Flores, J., Goldblatt, D., Briles, D., Hural, J., Malley, R., & Alderson, M. R. (2020). A Phase 1 Randomized, Placebo-controlled, Observer-blinded Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of Inactivated *Streptococcus pneumoniae* Whole-cell Vaccine in Adults. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 39(4), 345-351. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002567>

Khan, M. N., Xu, Q., & Pichichero, M. E. (2017). Protection against *Streptococcus pneumoniae* Invasive Pathogenesis by a Protein-Based Vaccine Is Achieved by Suppression of Nasopharyngeal Bacterial Density during Influenza A Virus Coinfection. *Infection and Immunity*, 85(2), e00530-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00530-16>

- Kim, J. O., Romero-Steiner, S., Sørensen, U. B. S., Blom, J., Carvalho, M., Barnard, S., Carlone, G., & Weiser, J. N. (1999). Relationship between Cell Surface Carbohydrates and Intrastrain Variation on Opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, *67*(5), 2327-2333. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.5.2327-2333.1999>
- Klein, E. Y., Monteforte, B., Gupta, A., Jiang, W., May, L., Hsieh, Y., & Dugas, A. (2016). The frequency of influenza and bacterial coinfection : A systematic review and meta-analysis. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, *10*(5), 394-403. <https://doi.org/10.1111/irv.12398>
- Klugman, K. P., & Lonks, J. R. (2005). Hidden Epidemic of Macrolide-resistant Pneumococci. *Emerging Infectious Diseases*, *11*(6), 802-807. <https://doi.org/10.3201/eid1106.050147>
- Krupka, M., Cabré, E. J., Jiménez, M., Rivas, G., Rico, A. I., & Vicente, M. (2014). Role of the FtsA C Terminus as a Switch for Polymerization and Membrane Association. *MBio*, *5*(6), e02221-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02221-14>
- Kumar, S., Mollo, A., Kahne, D., & Ruiz, N. (2022). The Bacterial Cell Wall : From Lipid II Flipping to Polymerization. *Chemical Reviews*, *122*(9), 8884-8910. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00773>
- Laloux, G., & Jacobs-Wagner, C. (2013). Spatiotemporal control of PopZ localization through cell cycle-coupled multimerization. *Journal of Cell Biology*, *201*(6), 827-841. <https://doi.org/10.1083/jcb.201303036>
- Land, A. D., Luo, Q., & Levin, P. A. (2014). Functional Domain Analysis of the Cell Division Inhibitor EzrA. *PLoS ONE*, *9*(7), e102616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102616>
- Land, A. D., Tsui, H.-C. T., Kocaoglu, O., Vella, S. A., Shaw, S. L., Keen, S. K., Sham, L.-T., Carlson, E. E., & Winkler, M. E. (2013). Requirement of essential Pbp2x and GpsB for septal ring closure in *Streptococcus pneumoniae* D39 : Essential role of GpsB in pneumococcal division. *Molecular Microbiology*, *90*(5), 939-955. <https://doi.org/10.1111/mmi.12408>
- Lara, B., Rico, A. I., Petruzzelli, S., Santona, A., Dumas, J., Biton, J., Vicente, M., Mingorance, J., & Massidda, O. (2004). Cell division in cocci : Localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein: FtsA in *Streptococcus pneumoniae* division. *Molecular Microbiology*, *55*(3), 699-711. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04432.x>
- Le Gouëllec, A., Roux, L., Fadda, D., Massidda, O., Vernet, T., & Zapun, A. (2008). Roles of Pneumococcal DivIB in Cell Division. *Journal of Bacteriology*, *190*(13), 4501-4511. <https://doi.org/10.1128/JB.00376-08>
- Leclercq, R., & Courvalin, P. (2002). Resistance to Macrolides and Related Antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(9), 2727-2734. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.9.2727-2734.2002>

Lee, J. J., Kang, C.-M., Lee, J. H., Park, K. S., Jeon, J. H., & Lee, S. H. (2014). *Phosphorylation-dependent interaction between a serine/threonine kinase PknA and a putative cell division protein Wag31 in Mycobacterium tuberculosis.*

Leeuw, E., Graham, B., Phillips, G. J., ten Hagen-Jongman, C. M., Oudega, B., & Luirink, J. (1999). Molecular characterization of Escherichia coli FtsE and FtsX. *Molecular Microbiology*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-2958.1999.01245.x>

Lenarcic, R., Halbedel, S., Visser, L., Shaw, M., Wu, L. J., Errington, J., Marenduzzo, D., & Hamoen, L. W. (2009). Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *The EMBO Journal*, 28(15), 2272-2282. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.129>

Levin, P. A., Kurtser, I. G., & Grossman, A. D. (1999). Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in Bacillus subtilis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(17), 9642-9647. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9642>

Levy, Varon, Picard, Bechet, & Martinot. (2014). Trends of Pneumococcal Meningitis in Children After... : The Pediatric Infectious Disease Journal. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000451>

Li, X., Gerlach, D., Du, X., Larsen, J., Stegger, M., Kühner, P., Peschel, A., Xia, G., & Winstel, V. (2015). An accessory wall teichoic acid glycosyltransferase protects Staphylococcus aureus from the lytic activity of Podoviridae. *Scientific Reports*, 5(1), 17219. <https://doi.org/10.1038/srep17219>

Low, H. H., Moncrieffe, M. C., & Löwe, J. (2004). The Crystal Structure of ZapA and its Modulation of FtsZ Polymerisation. *Journal of Molecular Biology*, 341(3), 839-852. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.031>

Löwe, J., & Amos, L. A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature*, 391(6663), 203-206. <https://doi.org/10.1038/34472>

Lu, C., Reedy, M., & Erickson, H. P. (2000). Straight and Curved Conformations of FtsZ Are Regulated by GTP Hydrolysis. *Journal of Bacteriology*, 182(1), 164-170. <https://doi.org/10.1128/JB.182.1.164-170.2000>

Lutkenhaus, J. (2007). Assembly Dynamics of the Bacterial MinCDE System and Spatial Regulation of the Z Ring. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 539-562. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142652>

MacLeod, C. M., Hodges, R. G., Heidelberger, M., & Bernhard, W. G. (1945). PREVENTION OF PNEUMOCOCCAL PNEUMONIA BY IMMUNIZATION WITH SPECIFIC CAPSULAR POLYSACCHARIDES. *The Journal of Experimental Medicine*, 82(6), 445-465.

Manuse, S., Fleurie, A., Zucchini, L., Lesterlin, C., & Grangeasse, C. (2016). *Role of eukaryotic-like serine/threonine kinases in bacterial cell division and morphogenesis.*

- Manuse, S., Jean, N. L., Guinot, M., Lavergne, J.-P., Laguri, C., Bougault, C. M., VanNieuwenhze, M. S., Grangeasse, C., & Simorre, J.-P. (2016). Structure–function analysis of the extracellular domain of the pneumococcal cell division site positioning protein MapZ. *Nature Communications*, 7(1), 12071. <https://doi.org/10.1038/ncomms12071>
- Margolin, W. (2000). Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 531-548. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00554.x>
- Marmont, L. S., & Bernhardt, T. G. (2020). A conserved subcomplex within the bacterial cytokinetic ring activates cell wall synthesis by the FtsW-FtsI synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(38), 23879-23885. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004598117>
- Marston, A. L., & Errington, J. (1999). Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. *Molecular Microbiology*, 33(1), 84-96. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01450.x>
- Massey, T. H., Mercogliano, C. P., Yates, J., Sherratt, D. J., & Löwe, J. (2006). Double-Stranded DNA Translocation : Structure and Mechanism of Hexameric FtsK. *Molecular Cell*, 23(4), 457-469. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.019>
- Massidda, O., Anderluzzi, D., Friedli, L., & Feger, G. (1998). Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, 144(11), 3069-3078. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3069>
- Massidda, O., Nováková, L., & Vollmer, W. (2013). From models to pathogens : How much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division?: Cell division in *S. pneumoniae*. *Environmental Microbiology*, 15(12), 3133-3157. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12189>
- Matias, V. R. F., & Beveridge, T. J. (2006). Native Cell Wall Organization Shown by Cryo-Electron Microscopy Confirms the Existence of a Periplasmic Space in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 188(3), 1011-1021. <https://doi.org/10.1128/JB.188.3.1011-1021.2006>
- McCullers, J. A. (2014). The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nature Reviews Microbiology*, 12(4), 252-262. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3231>
- McKinney, S. A., Murphy, C. S., Hazelwood, K. L., & Looger, L. L. (2009). *A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein for fusion tags.*
- Mellroth, P., Daniels, R., Eberhardt, A., Rönnlund, D., Blom, H., Widengren, J., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2012). LytA, Major Autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, Requires Access to Nascent Peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 11018-11029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318584>

Mercy, C., Ducret, A., Slager, J., Lavergne, J.-P., Freton, C., Nagarajan, S. N., Garcia, P. S., Noirot-Gros, M.-F., Dubarry, N., Nourikyan, J., Veening, J.-W., & Grangeasse, C. (2019). RocS drives chromosome segregation and nucleoid protection in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Microbiology*, *4*(10), 1661-1670. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0472-z>

Mirouze, N., Bergé, M. A., Soulet, A.-L., Mortier-Barrière, I., Quentin, Y., Fichant, G., Granadel, C., Noirot-Gros, M.-F., Noirot, P., Polard, P., Martin, B., & Claverys, J.-P. (2013). Direct involvement of DprA, the transformation-dedicated RecA loader, in the shut-off of pneumococcal competence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(11). <https://doi.org/10.1073/pnas.1219868110>

Misra, G., Rojas, E. R., Gopinathan, A., & Huang, K. C. (2013). Mechanical Consequences of Cell-Wall Turnover in the Elongation of a Gram-Positive Bacterium. *Biophysical Journal*, *104*(11), 2342-2352. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.04.047>

Mook-Kanamori, B. B., Geldhoff, M., Van Der Poll, T., & Van De Beek, D. (2011). Pathogenesis and Pathophysiology of Pneumococcal Meningitis. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*(3), 557-591. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-11>

Morgan, P. J., Hyman, S. C., Rowe, A. J., Mitchell, T. J., Andrew, P. W., & Saibil, H. R. (1995). Subunit organisation and symmetry of pore-forming, oligomeric pneumolysin. *FEBS Letters*, *371*(1), 77-80. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00887-F](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00887-F)

Morlot, C., NOIRCLERC-SAVOYE, ZAPUN, DIDEBERG, & VERNET. (2004). *The d,d-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of Streptococcus pneumoniae*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-2958.2003.03953.x>

Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O., & Vernet, T. (2003). Growth and division of *Streptococcus pneumoniae* : Localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Molecular Microbiology*, *50*(3), 845-855. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03767.x>

Moynihan, P. J., & Clarke, A. J. (2010). O-Acetylation of Peptidoglycan in Gram-negative Bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(17), 13264-13273. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107086>

Mura, A., Fadda, D., Perez, A. J., Danforth, M. L., Musu, D., Rico, A. I., Krupka, M., Denapaite, D., Tsui, H.-C. T., Winkler, M. E., Branny, P., Vicente, M., Margolin, W., & Massidda, O. (2017). Roles of the Essential Protein FtsA in Cell Growth and Division in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, *199*(3). <https://doi.org/10.1128/JB.00608-16>

Nakamura, S., Davis, K. M., & Weiser, J. N. (2011). Synergistic stimulation of type I interferons during influenza virus coinfection promotes *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(9), 3657-3665. <https://doi.org/10.1172/JCI57762>

- Nguyen, H.-A., El Khoury, T., Guiral, S., Laaberki, M.-H., Candusso, M.-P., Galisson, F., Foucher, A.-E., Kesraoui, S., Ballut, L., Vallet, S., Orelle, C., Zucchini, L., Martin, J., Page, A., Attieh, J., Aghajari, N., Grangeasse, C., & Jault, J.-M. (2017). Expanding the Kinome World : A New Protein Kinase Family Widely Conserved in Bacteria. *Journal of Molecular Biology*, 429(20), 3056-3074. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.08.016>
- Noens, E. E. E., Mersinias, V., Traag, B. A., Smith, C. P., Koerten, H. K., & Van Wezel, G. P. (2005). SsgA-like proteins determine the fate of peptidoglycan during sporulation of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 58(4), 929-944. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04883.x>
- Noirclerc-Savoye, M., Le Gouëllec, A., Morlot, C., Dideberg, O., Vernet, T., & Zapun, A. (2005). *In vitro* reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 55(2), 413-424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04408.x>
- Ochsner, U. A., Vasil, A. I., Johnson, Z., & Vasil, M. L. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* fur Overlaps with a Gene Encoding a Novel Outer Membrane Lipoprotein, OmlA. *Journal of Bacteriology*, 181(4), 1099-1109. <https://doi.org/10.1128/JB.181.4.1099-1109.1999>
- Oliva, M. A., Halbedel, S., Freund, S. M., Dutow, P., Leonard, T. A., Veprintsev, D. B., Hamoen, L. W., & Löwe, J. (2010). Features critical for membrane binding revealed by DivIVA crystal structure. *The EMBO Journal*, 29(12), 1988-2001. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.99>
- Osawa, M., & Erickson, H. P. (2018). Turgor Pressure and Possible Constriction Mechanisms in Bacterial Division. *Frontiers in Microbiology*, 9, 111. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00111>
- Palmer, M. (2001). The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon*, 39(11), 1681-1689. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00155-6)
- Park, K.-T., Pichoff, S., Du, S., & Lutkenhaus, J. (2021). FtsA acts through FtsW to promote cell wall synthesis during cell division in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(35), e2107210118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2107210118>
- Pasquina-Lemonche, L., Burns, J., Turner, R. D., Kumar, S., Tank, R., Mullin, N., Wilson, J. S., Chakrabarti, B., Bullough, P. A., Foster, S. J., & Hobbs, J. K. (2020). The architecture of the Gram-positive bacterial cell wall. *Nature*, 582(7811), 294-297. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2236-6>
- Pasteur, L. (1881). Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*, 94-103.
- Patrick, J. E., & Kearns, D. B. (2008). MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 70(5), 1166-1179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06469.x>

Perez, A. J., Cesbron, Y., Shaw, S. L., Bazan Villicana, J., Tsui, H.-C. T., Boersma, M. J., Ye, Z. A., Tovpeko, Y., Dekker, C., Holden, S., & Winkler, M. E. (2019). Movement dynamics of divisome proteins and PBP2x:FtsW in cells of *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(8), 3211-3220. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816018116>

Perez, A. J., Villicana, J. B., Tsui, H.-C. T., Danforth, M. L., Benedet, M., Massidda, O., & Winkler, M. E. (2021). FtsZ-Ring Regulation and Cell Division Are Mediated by Essential EzrA and Accessory Proteins ZapA and ZapJ in *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 780864. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.780864>

Peric, A., Weiss, J., Vulliemoz, N., Baud, D., & Stojanov, M. (2019). Bacterial Colonization of the Female Upper Genital Tract. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(14), 3405. <https://doi.org/10.3390/ijms20143405>

Pichoff, S. (2002). Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, *21*(4), 685-693. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.4.685>  
Pichoff, S., Du, S., & Lutkenhaus, J. (2019). Roles of FtsEX in cell division. *Research in Microbiology*, *170*(8), 374-380. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.07.003>

Pichoff, S., & Lutkenhaus, J. (2005). Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA : Membrane tethering of Z ring by FtsA. *Molecular Microbiology*, *55*(6), 1722-1734. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04522.x>

Pompeo, F., Byrne, D., Mengin-Lecreulx, D., & Galinier, A. (2018). Dual regulation of activity and intracellular localization of the PASTA kinase PrkC during *Bacillus subtilis* growth. *Scientific Reports*, *8*(1), 1660. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20145-2>

Pompeo, F., Foulquier, E., Serrano, B., Grangeasse, C., & Galinier, A. (2015). Phosphorylation of the cell division protein GpsB regulates PrkC kinase activity through a negative feedback loop in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *97*(1), 139-150. <https://doi.org/10.1111/mmi.13015>

Popoola, B., Waluschka, A., & Lorian, V. (s. d.). Pneumococcal Beta Hemolysin Produced Under the Effect of Antibiotics. *APPL. MICROBIOL.*

Ramamurthi, K. S., & Losick, R. (2009). Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(32), 13541-13545. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906851106>

Raskin, D. M., & De Boer, P. A. J. (1997). The MinE Ring : An FtsZ-Independent Cell Structure Required for Selection of the Correct Division Site in *E. coli*. *Cell*, *91*(5), 685-694. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80455-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80455-9)

- Ravikumar, V., Shi, L., Krug, K., Derouiche, A., Jers, C., Cousin, C., Kobir, A., Mijakovic, I., & Macek, B. (2014). Quantitative Phosphoproteome Analysis of *Bacillus subtilis* Reveals Novel Substrates of the Kinase PrkC and Phosphatase PrpC. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(8), 1965-1978. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035949>
- Rismondo, J., Cleverley, R. M., Lane, H. V., Großhennig, S., Steglich, A., Möller, L., Mannala, G. K., Hain, T., Lewis, R. J., & Halbedel, S. (2016). Structure of the bacterial cell division determinant GpsB and its interaction with penicillin-binding proteins. *Molecular Microbiology*, 99(5), 978-998. <https://doi.org/10.1111/mmi.13279>
- Rogers, P. D., Liu, T. T., Barker, K. S., Hilliard, G. M., English, B. K., Thornton, J., Swiatlo, E., & McDaniel, L. S. (2007). Gene expression profiling of the response of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(4), 616-626. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl560>
- Rojas, E. R., & Huang, K. C. (2018). Regulation of microbial growth by turgor pressure. *Current Opinion in Microbiology*, 42, 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.015>
- Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J. N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A., & Masure, H. R. (1997). Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 25(5), 819-829. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1997.mmi494.x>
- Ruiz, N. (2008). Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(40), 15553-15557. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808352105>
- Ruiz, N. (2015). Lipid Flippases for Bacterial Peptidoglycan Biosynthesis. *Lipid Insights*, 8s1, LPI.S31783. <https://doi.org/10.4137/LPI.S31783>
- Sáez-Llorens, X., & McCracken, G. H. (2003). Bacterial meningitis in children. *The Lancet*, 361(9375), 2139-2148. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13693-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13693-8)
- Sánchez, M., Valencia, A., Ferrándiz, M. J., Sander, C., & Vicente, M. (1994). Correlation between the structure and biochemical activities of FtsA, an essential cell division protein of the actin family. *The EMBO Journal*, 13(20), 4919-4925. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06819.x>
- Sanchez-Beato, A. R., & Garcia, J. L. (1998). Molecular characterization of PcpA: A novel choline-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters*, 164(1), 207-214. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13087.x>
- Sardis, M. F., Bohrhunter, J. L., Greene, N. G., & Bernhardt, T. G. (2021). The LpoA activator is required to stimulate the peptidoglycan polymerase activity of its cognate cell wall synthase PBP1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(35), e2108894118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2108894118>

Scheffers, D.-J., & Driessen, A. J. M. (2001). The polymerization mechanism of the bacterial cell division protein FtsZ. *FEBS Letters*, *506*(1), 6-10. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02855-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02855-1)

Schumacher, D., Bergeler, S., Harms, A., Vonck, J., Huneke-Vogt, S., Frey, E., & Sogaard-Andersen, L. (2017). The PomXYZ Proteins Self-Organize on the Bacterial Nucleoid to Stimulate Cell Division. *Developmental Cell*, *41*(3), 299-314.e13. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.04.011>

Scott Cayley, D., Guttman, H. J., & Thomas Record, M. (2000). Biophysical Characterization of Changes in Amounts and Activity of Escherichia coli Cell and Compartment Water and Turgor Pressure in Response to Osmotic Stress. *Biophysical Journal*, *78*(4), 1748-1764. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76726-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76726-9)

Sham, L.-T., Butler, E. K., Lebar, M. D., Kahne, D., Bernhardt, T. G., & Ruiz, N. (2014). MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science*, *345*(6193), 220-222. <https://doi.org/10.1126/science.1254522>

Sham, L.-T., Jensen, K. R., Bruce, K. E., & Winkler, M. E. (2013). Involvement of FtsE ATPase and FtsX Extracellular Loops 1 and 2 in FtsEX-PcsB Complex Function in Cell Division of *Streptococcus pneumoniae* D39. *MBio*, *4*(4), e00431-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00431-13>

Shi, L., Pigeonneau, N., Ventroux, M., Derouiche, A., Bidnenko, V., Mijakovic, I., & Noirot-Gros, M.-F. (2014). Protein-tyrosine phosphorylation interaction network in *Bacillus subtilis* reveals new substrates, kinase activators and kinase cross-talk. *Frontiers in Microbiology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00538>

Shu, W.-S., & Huang, L.-N. (2022). Microbial diversity in extreme environments. *Nature Reviews Microbiology*, *20*(4), 219-235. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00648-y>  
Siber, G. (1994). Pneumococcal disease : Prospects for a new generation of vaccines. *Science*, *265*(5177), 1385-1387. <https://doi.org/10.1126/science.8073278>

Singh, J. K., Makde, R. D., Kumar, V., & Panda, D. (2008). SepF Increases the Assembly and Bundling of FtsZ Polymers and Stabilizes FtsZ Protofilaments by Binding along Its Length. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(45), 31116-31124. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805910200>

Sklar, J. G., Wu, T., Gronenberg, L. S., Malinverni, J. C., Kahne, D., & Silhavy, T. J. (2007). Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(15), 6400-6405. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701579104>

Sternberg, G. M. (1881). *A fatal form of septicaemia in the rabbit produced by the subcutaneous injection of human saliva : An experimental research.* 87-108.

Straume, D., Stamsås, G. A., Berg, K. H., Salehian, Z., & Håvarstein, L. S. (2017). Identification of pneumococcal proteins that are functionally linked to penicillin-binding protein 2b (PBP2b): Identification of PBP2b accessory proteins. *Molecular Microbiology*, *103*(1), 99-116. <https://doi.org/10.1111/mmi.13543>

Strauss, M. P., Liew, A. T. F., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., Monahan, L. G., & Harry, E. J. (2012). 3D-SIM Super Resolution Microscopy Reveals a Bead-Like Arrangement for FtsZ and the Division Machinery: Implications for Triggering Cytokinesis. *PLoS Biology*, *10*(9), e1001389. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001389>

Subramanian, K., Henriques-Normark, B., & Normark, S. (2019). Emerging concepts in the pathogenesis of the *Streptococcus pneumoniae*: From nasopharyngeal colonizer to intracellular pathogen. *Cellular Microbiology*, *21*(11). <https://doi.org/10.1111/cmi.13077>

Szoke, T., Albocher, N., Govindarajan, S., Nussbaum-Shochat, A., & Amster-Choder, O. (2020). Tyrosine phosphorylation-dependent localization of TmaR, a novel E. coli polar protein that controls activity of the major sugar regulator by polar sequestration [Preprint]. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/2020.08.01.232603>

Szwedziak, P., Wang, Q., Freund, S. M., & Löwe, J. (2012). FtsA forms actin-like protofilaments : FtsA forms actin-like protofilaments. *The EMBO Journal*, *31*(10), 2249-2260. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.76>

Taconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... 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*(3), 318-327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)

Thanassi, J. A., Hartman-Neumann, S. L., Dougherty, T. J., Dougherty, B. A., & Pucci, M. J. (s. d.). *Identi<sup>®</sup>cation of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in.*

Thanbichler, M., & Shapiro, L. (2006). MipZ, a Spatial Regulator Coordinating Chromosome Segregation with Cell Division in Caulobacter. *Cell*, *126*(1), 147-162. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.038>

Tipper, & Strominger. (1965). Bacterial cell wall synthesis and structure in relation to the mechanism of action of penicillins and other antibacterial agents. *The American Journal of Medicine*, *39*(5), 708-721. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(65\)90093-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(65)90093-8)

Tonthat, N. K., Arold, S. T., Pickering, B. F., Van Dyke, M. W., Liang, S., Lu, Y., Beuria, T. K., Margolin, W., & Schumacher, M. A. (2011). Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor, SlmA, keeps cytokinesis in check : Mechanism of SlmA-mediated nucleoid occlusion. *The EMBO Journal*, *30*(1), 154-164. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.288>

Tonthat, N. K., Milam, S. L., Chinnam, N., Whitfill, T., Margolin, W., & Schumacher, M. A. (2013). SlmA forms a higher-order structure on DNA that inhibits cytokinetic Z-ring formation over the nucleoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(26), 10586-10591. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221036110>

Treuner-Lange, A., Aguiluz, K., Van Der Does, C., Gómez-Santos, N., Harms, A., Schumacher, D., Lenz, P., Hoppert, M., Kahnt, J., Muñoz-Dorado, J., & Søggaard-Andersen, L. (2013). PomZ, a ParA-like protein, regulates Z-ring formation and cell division in *Myxococcus xanthus*: Regulation of cell division in *M. xanthus*. *Molecular Microbiology*, *87*(2), 235-253. <https://doi.org/10.1111/mmi.12094>

Troeger, C., Blacker, B., Khalil, I. A., Rao, P. C., Cao, J., Zimsen, S. R. M., Albertson, S. B., Deshpande, A., Farag, T., Abebe, Z., Adetifa, I. M. O., Adhikari, T. B., Akibu, M., Al Lami, F. H., Al-Eyadhy, A., Alvis-Guzman, N., Amare, A. T., Amoako, Y. A., Antonio, C. A. T., ... Reiner, R. C. (2018). Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Infectious Diseases*, *18*(11), 1191-1210. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30310-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30310-4)

Trouve, J., Zapun, A., Arthaud, C., Durmort, C., Di Guilmi, A. M., Söderström, B., Pelletier, A., Grangeasse, C., Bourgeois, D., Wong, Y.-S., & Morlot, C. (2021). Nanoscale dynamics of peptidoglycan assembly during the cell cycle of *Streptococcus pneumoniae*. *Current Biology*, *31*(13), 2844-2856.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.041>

Tuomanen, & Thomasz. (1990). Mechanism of phenotypic tolerance of nongrowing pneumococci to beta-lactam antibiotics. *Scandinavian Journal of Infectious diseases*. <https://europepmc.org/article/MED/1982975>

Turapov, O., Forti, F., Kadhim, B., Ghisotti, D., Sassine, J., Straatman-Iwanowska, A., Bottrill, A. R., Moynihan, P. J., Wallis, R., Barthe, P., Cohen-Gonsaud, M., Ajuh, P., Vollmer, W., & Mukamolova, G. V. (2018). Two Faces of CwIM, an Essential PknB Substrate, in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Reports*, *25*(1), 57-67.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.004>

UNICEF. (2019). *UNICEF Annual Report 2019*.

van de Beek, D., de Gans, J., Tunkel, A. R., & Wijdicks, E. F. M. (2006). Community-Acquired Bacterial Meningitis in Adults. *New England Journal of Medicine*, *354*(1), 44-53. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052116>

Van Teeffelen, S., Wang, S., Furchtgott, L., Huang, K. C., Wingreen, N. S., Shaevitz, J. W., & Gitai, Z. (2011). The bacterial actin MreB rotates, and rotation depends on cell-wall assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(38), 15822-15827. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108999108>

Vilhena, C., Du, S., Battista, M., Westermann, M., Kohler, T., Hammerschmidt, S., & Zipfel, P. F. (2022). *The choline-binding proteins PspA, PspC and LytA of Streptococcus pneumoniae*

and their role on host cellular adhesion and damage [Preprint]. *Immunology*.  
<https://doi.org/10.1101/2022.07.08.499412>

Vollmer, W., Blanot, D., & De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 149-167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>

Vollmer, W., Massidda, O., & Tomasz, A. (2019). The Cell Wall of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, 7(3), 7.3.19. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0018-2018>

Vollmer, W., & Tomasz, A. (2000). The pgdA Gene Encodes for a PeptidoglycanN-Acetylglucosamine Deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20496-20501. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910189199>

Weiser, J. N., Austrian, R., Sreenivasan, P. K., & Masure, H. R. (1994). Phase variation in pneumococcal opacity : Relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infection and Immunity*, 62(6), 2582-2589. <https://doi.org/10.1128/iai.62.6.2582-2589.1994>

Weisfelt, M., De Gans, J., Van Der Poll, T., & Van De Beek, D. (2006). Pneumococcal meningitis in adults : New approaches to management and prevention. *The Lancet Neurology*, 5(4), 332-342. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70409-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70409-4)

Weng, L., Piotrowski, A., & Morrison, D. A. (2013). Exit from Competence for Genetic Transformation in *Streptococcus pneumoniae* Is Regulated at Multiple Levels. *PLoS ONE*, 8(5), e64197. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064197>

Weyder, M., Prudhomme, M., Bergé, M., Polard, P., & Fichant, G. (2018). Dynamic Modeling of *Streptococcus pneumoniae* Competence Provides Regulatory Mechanistic Insights Into Its Tight Temporal Regulation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1637. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01637>

Whatmore, A. M., & Reed, R. H. (1990). Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis* : A possible role for K<sup>+</sup> in turgor regulation. *Journal of General Microbiology*, 136(12), 2521-2526. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-12-2521>

Willemse, J., Borst, J. W., De Waal, E., Bisseling, T., & Van Wezel, G. P. (2011). Positive control of cell division : FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of *Streptomyces*. *Genes & Development*, 25(1), 89-99. <https://doi.org/10.1101/gad.600211>

World Health Organisation. (2017). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. <https://www.who.int/en/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.

Wu, L. J., & Errington, J. (2004). Coordination of Cell Division and Chromosome Segregation by a Nucleoid Occlusion Protein in *Bacillus subtilis*. *Cell*, *117*(7), 915-925. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.002>

Wu, L. J., & Errington, J. (2012). Nucleoid occlusion and bacterial cell division. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(1), 8-12. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2671>

Wu, L. J., Ishikawa, S., Kawai, Y., Oshima, T., Ogasawara, N., & Errington, J. (2009). Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *The EMBO Journal*, *28*(13), 1940-1952. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.144>

Yahiaoui, R. Y., den Heijer, C. D., van Bijnen, E. M., Paget, W. J., Pringle, M., Goossens, H., Bruggeman, C. A., Schellevis, F. G., & Stobberingh, E. E. (2016). Prevalence and antibiotic resistance of commensal *Streptococcus pneumoniae* in nine European countries. *Future Microbiology*, *11*(6), 737-744. <https://doi.org/10.2217/fmb-2015-0011>

Yeats, C., Rawlings, N. D., & Bateman, A. (2004). The PepSY domain : A regulator of peptidase activity in the microbial environment? *Trends in Biochemical Sciences*, *29*(4), 169-172. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.02.004>

Young, K. D. (2006). The Selective Value of Bacterial Shape. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *70*(3), 660-703. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00001-06>

+

Zafar, M. A., Wang, Y., Hamaguchi, S., & Weiser, J. N. (2017). Host-to-Host Transmission of *Streptococcus pneumoniae* Is Driven by Its Inflammatory Toxin, Pneumolysin. *Cell Host & Microbe*, *21*(1), 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.12.005>

Zapun, A., Vernet, T., & Pinho, M. G. (2008). The different shapes of cocci. *FEMS Microbiology Reviews*, *32*(2), 345-360. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00098.x>

# Annexes



## Review

## Recent advances in bacterial signaling by serine/threonine protein kinases

Sathya Narayanan Nagarajan,<sup>1</sup> Cassandra Lenoir,<sup>1</sup> and Christophe Grangeasse  <sup>1,\*,@</sup>

It has been nearly three decades since the discovery of the first bacterial serine/threonine protein kinase (STPK). Since then, a blend of technological advances has led to the characterization of a multitude of STPKs and phosphorylation substrates in several bacterial species that finely regulate intricate signaling cascades. Years of intense research from several laboratories have demonstrated unexpected roles for serine/threonine phosphorylation, regulating not only bacterial growth and cell division but also antibiotic persistence, virulence and infection, metabolism, chromosomal biology, and cellular differentiation. This review aims to provide an account of the most recent and significant developments in this up and growing field in microbiology.

## Foreword

'It is not the strongest of the species that survive, not the most intelligent, but the one most responsive to change.' This statement has been attributed to Charles Darwin, who, in his most famous book *On the Origin of Species*, proposed the idea that variation and natural selection are necessary for a species to evolve and survive [1]. To sustain life, every viable cell needs to respond and adapt to its ever-changing external milieu. This is particularly true for bacteria in which post-translational modifications (PTMs) of proteins offer powerful adaptive and regulatory mechanisms [2]. Amongst them, **protein phosphorylation** (see [Glossary](#)) is the best and most extensively studied [3,4]. This modification was initially found to be mediated by **two-component systems (TCSs)** that involve sensor histidine protein kinases and their response regulator [5]. The TCS is now acknowledged as a hallmark of the PTMs used by bacteria [5]. It then took a while to demonstrate the presence of other types of protein kinases in bacterial genomes. Indeed, it was only in the 1990s that a particular type of tyrosine protein kinase, which shares some similarities with ATPases, and a serine/threonine protein kinase, whose catalytic domain is homologous to that of eukaryotic protein kinases, were discovered [6,7]. Since then, both have been shown to be widespread in bacterial genomes, and a constantly increasing number of studies have reported their crucial roles in regulating bacterial physiology [3,4,8,9]. This is particularly true for serine/threonine protein kinases, whose functions were still poorly understood. These enzymes are often named eukaryotic-like protein kinases because their catalytic domain comprises several conserved motifs that share homology with eukaryotic protein kinases [10,11]. However, given evidence that these protein kinases share a common evolutionary origin with their eukaryotic counterparts [12], it is more appropriate to name them Hank's type STPKs, thanks to Steven K. Hanks and coworkers who originally described this family of protein kinases [11]. Several lines of evidence describing the role of STPKs in bacterial cell growth and division, **antibiotic persistence**, virulence, and infection have been consistently published. This review aims to bring out the most important and recent developments in this field. Recent highlights on the regulation of bacterial metabolism, chromosome biology, and cell differentiation by STPKs are also briefly presented in [Boxes 1–3](#).

## Highlights

STPKs are the new hallmark of bacterial phosphosignaling, controlling all aspects of the bacterial physiology.

STPKs can be secreted to manipulate the host defense during infection.

STPKs and atypical protein kinases are key in antibiotic persistence.

STPKs are central regulators of cell division and morphogenesis in firmicutes and actinobacteria.

Developments in phosphoproteomics constantly reveals new phosphorylation targets.

The regulatory potential of STPKs in metabolism is still likely underestimated.

<sup>1</sup>Molecular Microbiology and Structural Biochemistry, UMR 5086, Université de Lyon, CNRS, IBCP building, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon Cedex 07, France

\*Correspondence: [christophe.grangeasse@ibcp.fr](mailto:christophe.grangeasse@ibcp.fr) (C. Grangeasse).  
©Twitter: @GrangeasseTeam; @CNRS; @UnivLyon1



### Box 1. STPKs and bacterial metabolism

In response to nutrient-limiting conditions, bacteria need to rapidly adapt their metabolic flux for survival. STPKs play a crucial role in allowing such modifications in metabolic pathways. For instance, mycobacteria require the STPK PknG and the protein GarA to fine-tune carbon and nitrogen metabolic flux in the host [89]. Briefly, in an unphosphorylated state, GarA prevents glutamate catabolism by allosterically binding to the  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase (KDH) complex and glutamate dehydrogenase (GDH) [90]. Recent work has demonstrated that PknG mediates rapid phosphorylation of GarA in the presence of exogenous amino acids. Phosphorylation of GarA alleviates the inhibition of KDH and GDH enzymes, thereby allowing glutamate catabolism [91]. Further, the integral membrane proteins GlnH and GlnX were shown to be crucial to sense amino acid availability to activate PknG and modulate GarA phosphorylation and glutamate metabolism [92]. In *Escherichia coli*, the STPK YeaG is responsible for displaying metabolic heterogeneity upon nitrogen starvation to allow cell survival [93]. YeaG transcriptionally represses the two toxin/antitoxin modules, MqsR/MqsA and DinJ/YafQ, and allows expression of the bacterial stress response regulator RpoS [93]. More recently, the quantitative phosphoproteomic analysis of *E. coli* showed that the isocitrate lyase AceA is also targeted by YeaG when the carbon source is shifted from glucose to malate [94].

### PrkC of *Bacillus subtilis*, the archetype STPK regulating bacterial development and adaptation

Several reports have demonstrated the existence of varying numbers of cytoplasmic and membrane STPKs with different architectures, all comprising a conserved catalytic domain [4]. Genome-wide analysis of several Gram-positive bacteria reveals the existence of at least one STPK with an extracellular PASTA domain (Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase-Associated) [13]. To date, the study of these membrane STPKs represents the primary source of knowledge regarding bacterial phosphosignaling by STPKs. A perfect example illustrating the functions of PASTA-containing STPKs is PrkC of *Bacillus subtilis* which has three PASTA motifs [14]. A pioneering work showed that PrkC plays a crucial role in spore germination, wherein binding of **peptidoglycan** fragments to its extracellular PASTA domain leads to vegetative

### Box 2. STPKs and chromosome biology

The maintenance of genomic integrity is an essential aspect of bacterial survival. Environmental bacteria and intracellular pathogens are often exposed to oxidative or nitrosative stress, causing severe DNA damage. Recent investigations also highlight the role of STPKs in regulating several aspects of chromosomal biology.

For instance, extremophilic bacteria, such as *Deinococcus radiodurans*, have remarkable tolerance to radiation-induced DNA damage [95]. Recent work has discovered the existence of a DNA-damage-responsive STPK, RqkA [96]. RqkA has multiple pyrroloquinoline-quinone (PQQ) binding motifs. The binding of the antioxidant PQQ (crucial for DNA repair), or exposure to gamma irradiations, increases phosphorylation of RqkA and its targets [96]. In recent years, a few targets of RqkA have been characterized. For instance, RecA involved in DNA repair and homologous recombination is phosphorylated, and phosphorylation modulates its DNA-binding affinity and strand-exchange activities [97]. Of note, the cell division proteins FtsZ and FtsA are phosphorylated by RqkA, and the phosphorylation levels of these proteins are altered in response to radiation [98].

*Bacillus subtilis* also harbors an STPK, YabT, that has a DNA-binding motif required to activate its kinase activity upon DNA binding. YabT is specifically expressed during **sporulation** and favors chromosome integrity through RecA phosphorylation [99]. Loss of RecA phosphorylation by YabT also reduces the resistance to DNA damage during sporulation [99]. In mycobacteria, antibiotic resistance is primarily acquired through chromosomal mutations [100]. A stable isotope labeling by amino acid in cell culture (SILAC) based phosphoproteome screen identified phosphorylation of RecA in *Mycobacterium tuberculosis* in response to DNA damage [100]. RecA phosphorylation suppresses the emergence of antibiotic resistance by adversely affecting its coprotease activity, thereby preventing LexA degradation and SOS induction [100]. Moreover, the chromosome segregation protein ParB is phosphorylated in *Mycobacterium*. Phosphorylation of ParB affects its DNA-binding properties and its subcellular localization and interaction with ParA [101].

In *Streptomyces*, phosphorylation of the replication initiator protein DnaA by the STPK AfsK regulates DNA replication [102]. While phosphorylation increases the ATPase activity of DnaA, it induces conformational changes which decrease its binding affinity to the replication origin [102]. Finally, Stk1-mediated phosphorylation of the transcription factor SpoVG increases its DNA-binding affinity to the promoter of several target genes in *Staphylococcus aureus* [103]. On the contrary, in *M. tuberculosis*, PknB-mediated phosphorylation of the transcriptional regulator Lsr2 negatively modulates its DNA-binding ability which is required for adaptation under hypoxic conditions [104].

### Glossary

**Antibiotic persistence:** the phenomenon in which a bacterial population, exposed to an antibiotic, shows a biphasic killing curve, indicating the existence of two subpopulations – one that is rapidly cleared by the antibiotic and a minor population that is tolerant to the antibiotic and could survive.

**Lipid II precursor (undecaprenyl-diphosphate lipid):** a universal carrier of glycan subunits for the synthesis of bacterial carbohydrate polymers involved cell wall synthesis, including peptidoglycan, polysaccharide, and teichoic acids.

**Peptidoglycan:** the main component of the bacteria cell wall that confers mechanical resistance and maintains the integrity of the cell shape. It consists of sugar chains of alternating *N*-acetylglucosamine (NAG) and *N*-acetylmuramic acid (NAM) that are covalently linked to one another by short peptide chains.

**Phagosome maturation:** the process in which the internalized pathogen-containing vesicle undergoes stepwise maturation that allows acidification of the entire vesicle and fusion to the lysosome.

**Protein phosphorylation:** enzymatic reactions catalyzed by protein kinases made reversible through phosphoprotein phosphatases. The phosphate moiety is most often transferred utilizing ATP. In bacteria, phosphorylatable amino acids are serine, threonine, tyrosine, cysteine, histidine, aspartic acid, and arginine.

**Quiescence:** a phenomenon that reflects the dormant physiological state of a bacterium that does not grow and has decreased metabolic activity. Quiescence could lead to antibiotic tolerance.

**Sporulation:** the process in which some bacteria differentiate into morphologically distinct dormant cells, called 'spores', in response to nutritional starvation. Spores are resistant to heat, chemicals, and radiation.

**Two-component systems (TCSs):** regarded as the hallmark of bacterial signaling, these systems comprise a membrane-bound histidine protein kinase and a cytosolic response regulator. Once activated, the histidine kinase is autophosphorylated on a histidine residue. Subsequently, the phosphate moiety is transferred to an aspartate residue in the response regulator.

### Box 3. STPKs and cell differentiation

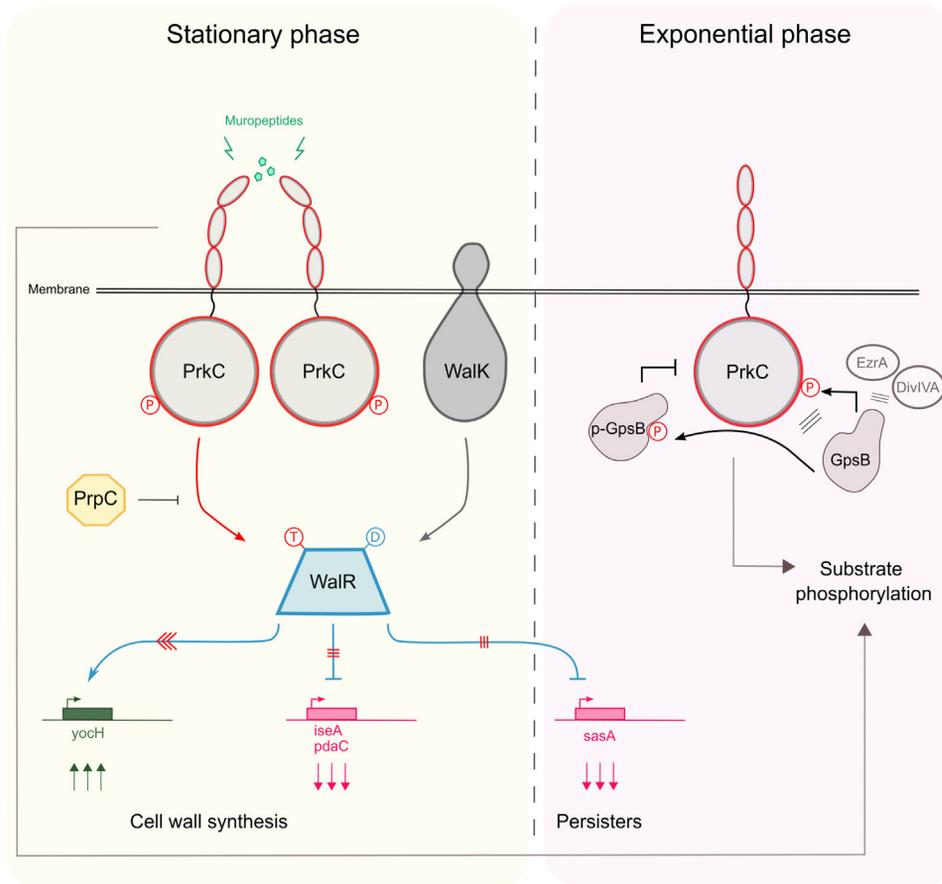
Cell differentiation in response to stress conditions is a remarkable property of many bacteria. When cells undergo nutritional starvation, bacteria need to reorient their energy expenditure and maintain a quiescent state. Protein synthesis is a high-energy-demanding cellular process. A novel mechanism, involving phosphorylation of the elongation factor EF-Tu, has been shown to downregulate protein synthesis during sporulation in *Bacillus subtilis* [105]. In this bacterium, the STPK YabT phosphorylates EF-Tu to impair its GTPase activity, thus preventing its release from ribosomes. This leads to the inhibition of protein synthesis and drives cells to quiescence [105].

An important bacterial cell differentiation process is sporulation, wherein planktonic cells differentiate into physiologically dormant spores which remain dormant until the onset of favorable growth conditions. In *B. subtilis*, YabT phosphorylates the DNA-initiation control protein YabA [106]. While YabA phosphorylation did not affect replication initiation, it led to an increase in sporulation efficiency and, at the same time, inhibited biofilm formation [106]. Moreover, the STPK PrkA plays a role in sporulation in *Bacillus* [107]. Deletion of *prkA* led to sporulation defects, and interestingly, transcriptional analysis of the mutant demonstrated decreased expression of the sporulation-specific transcription factor  $\sigma^k$  and its downstream genes [107]. Recently, a new family of atypical protein kinases has been identified in *B. subtilis* [108]. CotH, an outer-coat protein, was found to have an atypical protein kinase fold [108]. It phosphorylates the two other outer-coat proteins, CotB and CotG. Loss of their phosphorylation affects the spore coat structure [109]. In addition, deletion of *cotH* hampers spore germination [109]. Another example concerns *Streptomyces*, a multicellular bacterium with different developmental stages, including a vegetative hypha, secondary-metabolite-producing hyphae, and sporulating hyphae. In this bacterium, deletion of *pkal* leads to the generation of aberrant spores. The finding that the cell-division proteins MreC and PBP2 are phosphorylated by Pkal suggests that phosphorylation is crucial to regulate septum formation during sporulation [110]. Moreover, recent phosphoproteomic studies identified about 40 STPKs and extensive phosphorylation during cellular differentiation [111]. Interestingly, the cell-division protein FtsZ is one of the targets, and its phosphorylation regulates sporulation and production of the antibiotic actinorhodin [111]. Finally, the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. encodes several STPKs that are involved in regulating growth and differentiation [112].

growth [15]. Since then, subsequent studies have provided further evidence on the function of PrkC in other critical aspects of *B. subtilis* physiology: modulating cell wall synthesis and antibiotic tolerance (Figure 1). These two processes are regulated through phosphorylation of the response regulator WalR by its cognate sensor histidine protein kinase WalK [16]. In addition, PrkC and its cognate phosphatase, PrpC, also mediate reversible phosphorylation of WalR. Consequently, PrkC/PrpC-mediated signaling augments WalR activity in regulating cell wall synthesis through transcriptional regulation of the WalR regulon. PrkC/PrpC-mediated regulation seems to be important for bacterial viability during the stationary phase [16]. In addition, phosphorylation of WalR by PrkC modulates stochasticity in the transcription of the pGpp synthase *sasA*, resulting in development of cells that are antibiotic tolerant - (Figure 1) [17].

Recent work has provided many insights into the mechanistic regulation of PrkC activation. While the extracellular PASTA domain of PrkC is dispensable for localization and activation during exponential growth, it plays a vital role during the stationary phase (Figure 1) [18,19]. During the stationary phase, the binding of peptidoglycan fragments to the extracellular PASTA domain of PrkC triggers its dimerization/oligomerization, leading to activation of its cytosolic kinase domain. During exponential growth, direct interaction of PrkC with the cell-division proteins EzrA, DivIVA, and GpsB mediates its localization to the division site. Importantly, GpsB triggers PrkC autophosphorylation and substrate phosphorylation (Figure 1). GpsB itself is a phosphorylation target of PrkC, and a phosphomimetic variant of GpsB downregulates PrkC's catalytic activity (Figure 1) [19]. Thus, regulation of PrkC activity seems to be more complex than initially perceived (Figure 1) [19]. Similarly, deletion of *gpsB* in *Streptococcus pneumoniae* affects the localization and catalytic activity of the PASTA-containing STPK StkP, leading to aberrant cell morphology [20].

Various other substrates of PrkC have been identified in recent years. For instance, PrkC-mediated phosphorylation of the lipoteichoic acid synthase YfnI modulates its catalytic activity [21]. Moreover, the PrkC of *Bacillus anthracis* affects biofilm formation through phosphorylation of the chaperone GroEL [22]. PrkC is also able to phosphorylate the glycolytic enzyme enolase,



Trends in Microbiology

**Figure 1.** Mechanistic insights into the activation and signaling of the serine/threonine protein kinase (STPK) of *Bacillus subtilis* (PrkC). PrkC activation is regulated differentially depending on its growth phase. During the stationary phase, the binding of muropeptides (green pentagons) to the penicillin-binding protein and serine/threonine kinase-associated (PASTA) receptor allows PrkC dimerization and activation (lightning symbol). By contrast, during exponential growth, PrkC activation requires interaction with the cell division proteins GpsB, DivIVA, EzrA (three stripes indicate protein-protein interactions). Activation of PrkC results in the phosphorylation of several substrates, including GpsB. Phosphorylated GpsB is then able to downregulate PrkC activity. The histidine protein kinase Walk phosphorylates the response regulator WalR (blue trapezoid) on an aspartic amino acid residue (gray arrow). WalR phosphorylation allows transcriptional activation (green arrows) or repression (pink arrows) of its target genes crucial for stationary growth. In addition, WalR is also phosphorylated on a threonine residue by PrkC (red arrow). PrkC-mediated phosphorylation of WalR increases the regulatory effects due to Walk-mediated phosphorylation of WalR. The three red arrows atop the blue line indicate enhanced upregulation of *yochH*. The three red crosslines atop the blue line indicate further downregulation of the genes *iseA*, *pdaC*, and the pGpp synthase *sasA*. The phosphatase PrpC (orange octagon) dephosphorylates the phosphothreonine on WalR to maintain homeostasis and modulate the formation of persister cells through increased SasA expression.

thereby modulating spore formation and germination and allowing *B. anthracis* to adapt to nutrient deprivation [23]. Deletion of PrkC upregulates the expression of the murein hydrolase BslO and the outer-membrane protein Sap. The latter is required for the localization of BslO at the division septum. Upregulation of the genes encoding these two proteins leads to the generation of shorter chains of cells, directly compromising the virulence of *B. anthracis* [24].

Further studies in other bacterial species have highlighted crosstalk between other STPKs and TCS signal cascades. In *Enterococcus faecalis*, the TCS CroS/CroR and the PASTA-

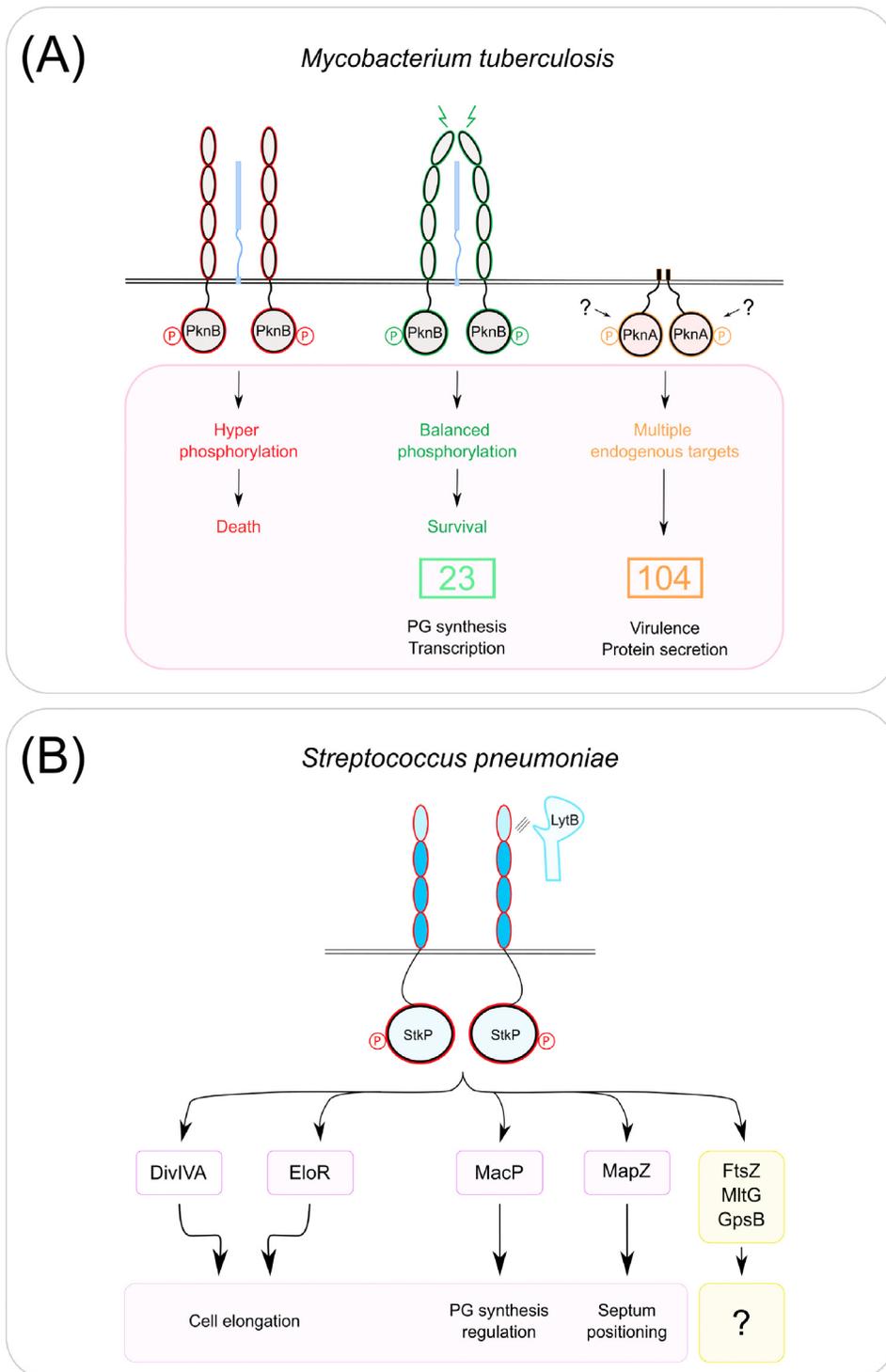
containing STPK IreK mediate resistance to several  $\beta$ -lactam antibiotics. IreK-mediated phosphorylation of the sensor histidine protein kinase CroS positively modulates gene expression of the CroS/R regulon in response to antibiotics, thereby allowing antibiotic resistance [25]. In *Staphylococcus aureus*, the PASTA-containing STPK PknB (also called Stk1) phosphorylates the response regulator WalR of the WalRK TCS [26]. Similarly, the PASTA-containing STPK StkP of *S. pneumoniae* facilitates regulation of the WalRK regulon by transducing signals through protein–protein interactions with the transmembrane domain of WalK [27]. Finally, in *Mycobacterium tuberculosis*, the PASTA-containing STPK PknB downregulates the activity of the DevS/DevR and SenX3/RegX3 TCS through phosphorylation of their response regulators [28,29]. This impacts expression of genes involved in hypoxia and phosphate acquisition required for intracellular survival.

### Pneumococcal and mycobacterial STPKs play a crucial role in regulating cell division

Recent work has led to crucial developments in the regulation of cell division by STPKs. Over the last few years, a key question has been to understand how STPKs are activated and how they phosphorylate their targets. Elegant studies have demonstrated that the binding of either muropeptides or **lipid-II precursors** to the extracellular PASTA domain could activate membrane STPKs [15,26,30]. Recent investigations have brought out new information into this activation mechanism.

In *M. tuberculosis*, critical residues in the extracellular PASTA domain of the STPK PknB are critical for lipid II binding (Figure 2A) [31]. Contrary to the hypothesis that ligand binding activates PASTA-containing STPKs, mutations that affect lipid II binding result in hyperphosphorylation of PknB and its downstream substrates, thereby disrupting cellular homeostasis (Figure 2A) [31]. In *S. pneumoniae*, activation of the PASTA-containing STPK StkP (comprising four PASTA motifs) is independent of peptidoglycan binding. While the three PASTA motifs closest to the membrane are interchangeable, their cumulative presence is crucial for StkP activity [32]. The distal-most PASTA motif (fourth PASTA motif) is required for StkP localization at the division septum, and its interaction with the cell division hydrolase LytB ensures the proper separation of daughter cells (Figure 2B) [32].

There have been many breakthroughs over the last few years in unearthing substrates of STPKs. In *S. pneumoniae*, characterizing the phosphorylation of cell division proteins, like DivIVA and MapZ, has already shown that STPKs are instrumental in regulating cell division and cell-wall homeostasis (Figure 2B) [33,34]. Since then, new phosphorylated cell-division proteins have also been discovered. This includes EloR (also known as Jag/KhpB), which is a novel cell-division protein that is involved in cell elongation (Figure 2B) [35,36]. Allelic exchange of a phosphoablative EloR results in cell shortening. In contrast, mutations mimicking constitutive phosphorylation are not tolerated unless accompanied by additional suppressor mutations of core proteins involved in cell elongation [37]. Moreover, a direct link between STPK-mediated phosphorylation and peptidoglycan synthesis has been demonstrated recently. For instance, MacP, a target of StkP, functions as a cofactor essential for the activity of the class A penicillin-binding protein (PBP), PBP2a (Figure 2B). A phosphoablative mutant of MacP fails to activate the catalytic activity of PBP2a, thereby affecting cell division [38]. More recently, a phosphoproteomic analysis of *S. pneumoniae* identified novel StkP targets, including the cell division proteins FtsZ, MltG, and GpsB [39]. Moreover, StkP plays a crucial role in coordinating cell division with competence, a developmental genetic program leading to genetic transformation. Interestingly, phosphorylation of several cell-division proteins is downregulated upon competence induction [40]. It is thus proposed that StkP, along with the competence regulator ComM, delays the cell cycle to maintain genome integrity [40].



Trends in Microbiology

(See figure legend at the bottom of the next page.)

In the case of *M. tuberculosis*, where there is substantive evidence regarding the role of STPKs in cell division. The STPKs PknA and PknB are essential for the survival and the modulation of cell shape, growth, and virulence [41–43]. Despite being independently essential, early studies have shown that these two STPKs commonly share multiple substrates and that PknB functions akin to a master regulator activating PknA [44,45]. Therefore, both STPKs were initially thought to regulate similar pathways. However, new genetic experiments demonstrate that activation of PknA is independent of PknB [42]. Moreover, their subcellular localizations are distinct, with PknB localizing to the poles and the septum while PknA primarily localizes along the membrane [42]. Recent studies using conditional knockouts and phosphoproteomic studies further show that both STPKs have distinct substrate preferences (Figure 2A) [46]. While depletion of PknA results in decreased phosphorylation of proteins involved in protein secretion, virulence, and translation, PknB depletion seems to affect the phosphorylation of proteins involved in peptidoglycan synthesis and transcriptional control [46]. For instance, upon exposure to nutritional or osmotic stress, PknB-mediated phosphorylation of a novel peptidoglycan amidase CwIM modulates peptidoglycan synthesis [47,48]. While phosphorylated CwIM localizes in the cytosol to augment the activity of MurA [47], unphosphorylated CwIM localizes to the membrane where it interacts with MurJ to modulate cell wall synthesis [48]. Moreover, the bifunctional PBP enzyme PonA1 is phosphorylated by PknB on its cytoplasmic tail [49]. Interestingly, its phosphorylation increases the elongation rate and affects cell length [49].

Several reports on STPKs harboring an extracellular PASTA domain in other Gram-positive bacteria also illustrate their roles in cell division. For instance, deletion of the *Listeria monocytogenes* STPK, PrkA, affects growth and cell morphology under nutrient starvation conditions [50]. Moreover, PrkA has been shown to phosphorylate the conserved protein ReoM involved in cell-wall regulation. Phosphorylation of ReoM modulates the steady-state levels of MurA by negatively regulating ClpCP-mediated proteolytic degradation [51]. In *Clostridioides difficile*, PrkC phosphorylates the peptidoglycan hydrolase CwlA [52]. Phosphorylation prevents CwlA export to the cell wall, thereby interfering with cell-wall hydrolysis, resulting in cell elongation and cell chaining [52]. In *S. aureus*, phosphorylation of the conserved Ser/Thr residues within the activation loop of the STPK Stk1 is necessary to maintain its activity [53]. In addition, Stk1 and the phosphatase Stp modulate cell-wall synthesis through reversible phosphorylation of the lipid II: glycine glycytransferase FemX. FemX catalyzes the interpeptide bridges in the peptidoglycan (PG) mesh [54]. Interestingly, crosstalk between STPKs and tyrosine protein kinase signaling pathways is essential to coordinate polysaccharide capsule assembly and cell-wall biosynthesis [55]. In *S. aureus*, the tyrosine protein kinase CapAB positively regulates capsule biosynthesis through tyrosine phosphorylation of several targets. A recent study shows that the STPK PknB

**Figure 2. Role of serine/threonine protein kinases (STPKs) in cell division.** (A) *Mycobacterium* STPKs PknA and PknB regulate cell division and morphogenesis. The middle panel represents the interaction of lipid II (in light blue) with the penicillin-binding protein and serine/threonine kinase-associated (PASTA) domains, which triggers dimerization and activation of PknB (lightning symbol), resulting in balanced phosphorylation of targets required for normal growth. The left-side panel shows that hampering lipid II interaction with PknB leads to hyperphosphorylation of targets and cell death. The right-side panel represents the regulation of PknA-mediated signaling. Activation of PknA is modulated through autophosphorylation on its activation loop, independently of PknB. It remains unclear as to which signals control PknA autophosphorylation and downstream signaling. Their substrate pools (in rectangle box) show minimal overlap. (B) Activation of StkP from *Streptococcus pneumoniae* is regulated by the three membrane-proximal PASTA domains (in dark blue). In contrast, the fourth distal PASTA domain (in light blue) is required to interact with the peptidoglycan hydrolase LytB (three stripes indicate interaction). Amongst several substrates identified, phosphorylation of DivVA, EloR, MapZ, and MacP is required for different stages of cell division. The role of novel StkP substrates, like the cell-division proteins FtsZ, MltG, and GpsB, is yet to be deciphered.

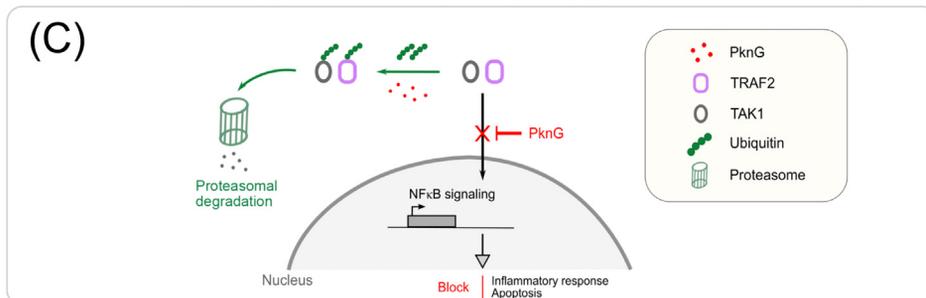
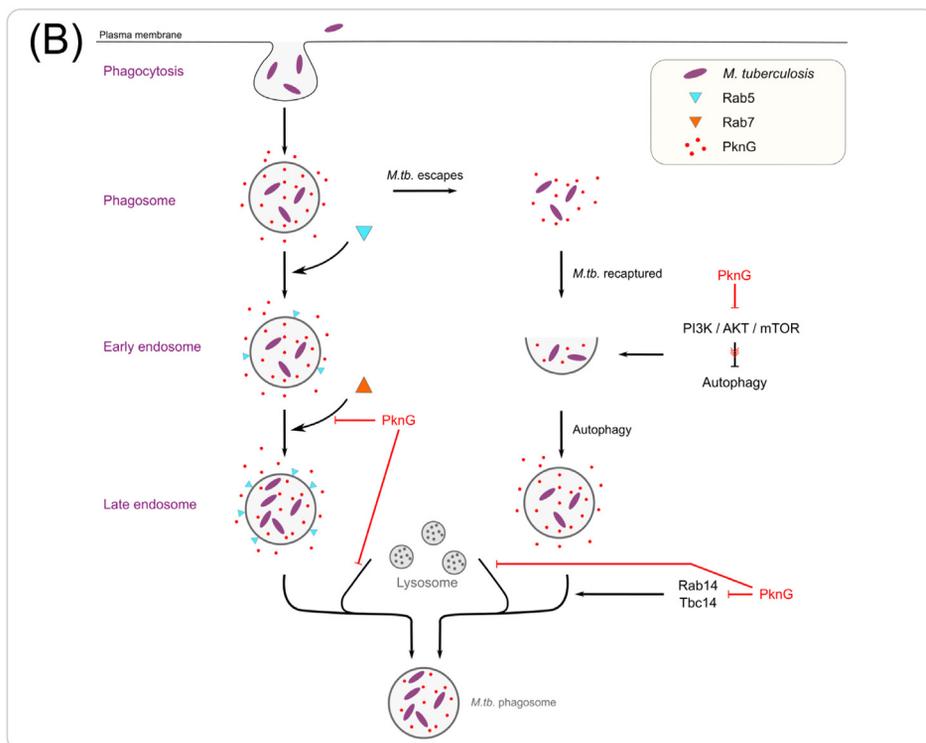
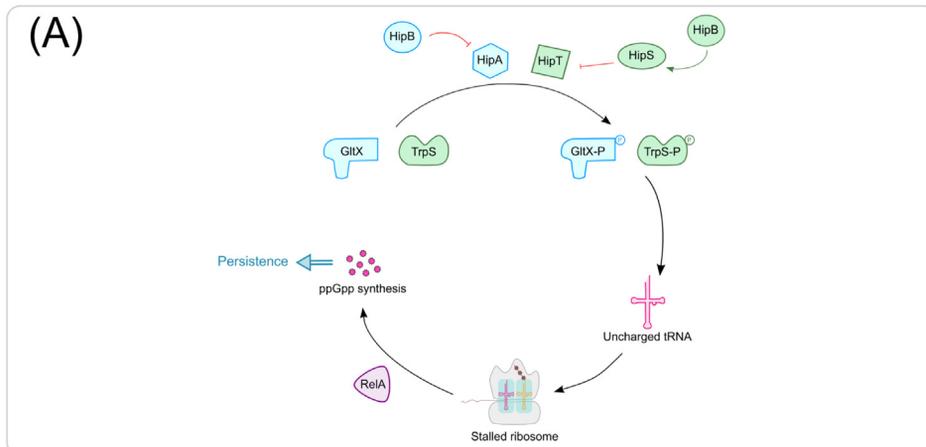
negatively modulates capsule assembly during exponential growth by phosphorylating CapAB and the priming glycosyltransferase CapM [55].

### Atypical protein kinases and STPKs drive antibiotic persistence

Chronic bacterial infections are hard to eradicate despite prolonged and adequate antibiotic therapy [56]. Indeed, phenotypic variations amongst bacterial populations allow bacterial cells to develop into persisters that remain dormant and become reservoirs of reinfections [56]. Several pathogens utilize STPKs to adapt and evolve in response to antibiotic treatment.

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) encodes four STPKs, one of which belongs to the type II toxin/antitoxin (TA) HipBA module. Within this module, HipA is the toxin exhibiting protein kinase activity, and HipB is the antitoxin. Binding of HipB to HipA inhibits the kinase activity of the latter (Figure 3A) [57,58]. In response to antibiotic stress, HipA phosphorylates and inhibits the glutamyl-tRNA synthetase GltX, leading to the generation of uncharged tRNAs [57,58]. The presence of uncharged tRNAs on the ribosomes activates RelA to synthesize the alarmone (p)ppGpp, thereby promoting bacterial persistence [57,58]. Of note, amongst the several HipA variants isolated, the HipA7 variant induces persistence more efficiently than HipA, whereas HipA is more effective in inhibiting growth than HipA7. [59]. Comparative phosphoproteomic studies indicate that, while HipA7 and HipA target GltX, HipA also targets several additional substrates leading to growth arrest [59]. Consequently, cells expressing HipA induce severe cellular toxicity while cells expressing HipA7 induce increased bacterial persistence [59]. Recently, a novel HipBST three-component TA module has been identified in *E. coli* (Figure 3A) [60]. The authors report that the HipA gene is split into two genes, *hipS* and *hipT*, wherein HipS and HipT exhibit sequence similarity with the N terminus and C terminus of HipA, respectively. HipT has protein kinase activity and functions as a toxin that phosphorylates the tryptophanyl-tRNA synthetase TrpS. Induction of HipT leads to growth arrest in a (p)ppGpp-dependent manner [60]. HipS functions as an antitoxin, with HipB augmenting the antitoxin activity of HipS in regulating the HipBST TA module [60]. Similarly, in *Caulobacter crescentus*, the toxins HipA<sub>1</sub> and HipA<sub>2</sub> phosphorylate the aminoacyl tRNA synthetases GltX and TrpS, respectively. In addition, the toxin HipA<sub>2</sub> perturbs the intracellular amino acid balance of tryptophan and glutamine triggering stringent response, which results in persistence [61,62].

Several Gram-positive bacteria responsible for severe infections in humans depend on STPKs for antibiotic sensitivity. The pathogenic bacterium *E. faecalis* is inherently resistant to cephalosporins and other  $\beta$ -lactam antibiotics. The PASTA-containing STPK IreK and the phosphatase IreP play a crucial role in modulating intrinsic resistance to cephalosporins [63]. Recent studies show that changes in nutrient conditions or antibiotic-induced cell-wall stress modulate the phosphorylation of both IreK and its substrate IreB [64]. Furthermore, differential phosphorylation on a single residue, T-218 of IreK, impacts protein kinase activation and cephalosporin resistance, indicating a possible regulatory mechanism [65]. Another example of an STPK modulating antibiotic sensitivity is PrkC of *C. difficile*, which plays a crucial role in maintaining cell-wall homeostasis and antibiotic resistance [66]. In *S. aureus*, the STPK Stk1 and the phosphatase Stp work together to modulate antibiotic resistance. Recent phosphoproteomic studies in *S. aureus*, using Stk1 and Stp null mutants, demonstrate that abrogation of phosphorylation levels of several cellular targets, including the essential translation elongation factor EF-G, results in reduced ATP levels and growth delay leading to metabolic **quiescence** in response to stress conditions [67,68]. The primary determinants of  $\beta$ -lactam resistance in *S. aureus* are mediated through the *mecA* and *blaZ* genes (involved in the production of Pbp2A and  $\beta$ -lactamase, respectively). In a recent study, *S. aureus* lacking *mecA* and *blaZ* still develops spontaneous antibiotic resistance in the presence of  $\beta$ -lactam antibiotics. Genomic analysis of these mutants revealed the presence of spontaneous loss of function point mutations in the phosphatase Stp. Hyperphosphorylation



resulting from the loss of Stp function results in resistance to nafcillin and other  $\beta$ -lactam antibiotics [69]. Further, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) becomes susceptible to the  $\beta$ -lactam antibiotics ceftriaxone and cefotaxime upon deletion of Stk1 [70]. Interestingly, a combination therapy involving ceftriaxone and cefotaxime along with a novel small molecule (a quinazoline compound named Inh2-B1) efficiently inhibits the growth of an MRSA strain. The small molecule Inh2-B1 binds directly to the ATP-binding pocket of the Stk1 kinase domain, thereby inhibiting its catalytic activity [70]. These studies demonstrate the regulatory potential of STPK-mediated phosphorylation to drive antibiotic resistance, which makes them attractive targets to be evaluated for antibiotic treatment.

### Intracellular pathogens exemplify the role of STPKs in virulence and infection

The *M. tuberculosis* STPK PknG was the first example of a nonmembrane STPK found to be secreted into the host cytosol. It prevents phagolysosome fusion, allowing bacteria to survive in the host [71]. Since then, many investigations have made advancements in delineating the mechanistic insights into how PknG modulates virulence of *M. tuberculosis* and, more specifically, how the bacterium secretes PknG and why it prevents phagolysosome fusion. The SecA2 secretion system of *M. tuberculosis* has been recently shown to be necessary for the secretion of PknG, and the phosphatase SapM, into the host. These two proteins block the exchange and recruitment of the late endosomal marker Rab7 into the phagosomal membrane (Figure 3B) [72]. Additionally, PknG interacts with the host endosomal marker Rab7L1 in the Golgi complex [73]. Through a direct interaction, PknG thus prevents the conversion of Rab7L1-GDP into the GTP-bound isoform, which blocks the recruitment of Rab7 and lysosomal markers into the phagosome membrane. PknG thus prevents **phagosome maturation** and phagolysosome fusion.

*M. tuberculosis* occasionally escapes the phagosome and enters the cytosol. A recent study demonstrates that cytosolic *M. tuberculosis* induces autophagy in a PknG-dependent manner [74]. In the host, the PI3K–AKT–mTOR signaling cascade blocks autophagy induction (Figure 3B) [74]. PknG competitively binds with the AKT protein kinase and blocks its activation, resulting in the downregulation of mTOR signaling. This results in autophagosome formation, which recaptures cytosolic *M. tuberculosis*. Moreover, PknG binds to an endosomal marker

**Figure 3. Role of serine/threonine protein kinases (STPKs) in antibiotic persistence and infection.** (A) Atypical protein kinases drive antibiotic persistence. The HipBA type II toxin/antitoxin (TA) module (blue) in *Escherichia coli* comprises the antitoxin HipB and the toxin protein kinase HipA. HipB forms a complex with HipA and inhibits its activity. Degradation of HipB allows HipA to phosphorylate and inhibit the glutamyl-tRNA synthetase GltX. Inhibition of GltX generates uncharged tRNAs (pink). The presence of uncharged tRNA in the ribosomes stalls protein synthesis and activates RelA (violet) to synthesize the alarmone ppGpp, resulting in bacterial persistence. The three-component HipBST type II TA module (green) is a split variant of the HipBA TA system. HipT functions as a protein kinase that phosphorylates the tryptophanyl tRNA synthetase TrpS. Similar to GltX, phosphorylation inhibits TrpS activity to allow bacterial persistence. Both the antitoxins HipB and HipS allow inhibition of HipT toxin. (B,C) Secretory PknG of *Mycobacterium* promotes cell survival in the host. (B) *M. tuberculosis* is engulfed within the phagosome by a host macrophage through phagocytosis. It secretes PknG (red dots) into the phagosomal lumen and the cytosol. PknG prevents the exchange of Rab5 (blue inverted triangle) with Rab7 (orange triangle) endosomal markers, thereby blocking phagosomal maturation and lysosome fusion (red stop lines indicate a block in the pathway), allowing bacterial survival. The right-side panel represents autophagy. *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) occasionally escapes from the phagosome into the cytosol. In the cytosol, PknG blocks the activation of host AKT protein kinase (red stop line). AKT and its partner PI3K activate mTOR signal cascade to block autophagy (black stop line). However, PknG-mediated inactivation of AKT ceases mTOR signaling and allows autophagy (the red arrows on the black stop line represents PknG favoring autophagy). This leads to autophagosome formation, which engulfs cytosolic *M.tb*. PknG blocks autophagosome fusion with lysosome by inhibiting the activities of Rab14 GTPase and its activator Tbc14. (C) The unconventional ability of PknG to ubiquitinate transcription factors TRAF2 and TAK1 leads to their proteasomal degradation. The catalytic domain of PknG functions akin to a ubiquitin ligase and marks TRAF2 and TAK1 for proteasomal degradation, thereby preventing its nuclear translocation. PknG hence plays a vital role in downregulating the NF $\kappa$ B signaling pathway and blocks the inflammatory response.

Rab14 and its activator protein TBC14, thereby interfering with autophagosome maturation [74]. This process facilitates *M. tuberculosis* to re-establish a replicating niche within the macrophage for its survival. In addition, PknG plays a vital role in maintaining intracellular redox balance and metabolic adaptation during hypoxia and oxidative stress conditions [75,76]. PknG, in association with the ribosomal protein L13 and the nudix hydrolase RenU, allows NADH hydrolysis and mitigates oxidative stress [75]. PknG also mediates persistence and drug tolerance through phosphorylation of GarA in response to hypoxia [76].

In addition to its protein kinase activity, an unusual role for PknG in proteasomal degradation has been identified recently (Figure 3C) [77]. The N-terminal lobe of the PknG protein kinase domain has a  $\beta$ -grasp fold similar to that found in the ubiquitin-like proteins [77]. Consequently, the kinase domain of PknG was shown to have bifunctional roles that mimic both E1 and E3 ubiquitin enzymes [77]. Further, PknG interacts with the (host) E2 ubiquitin-conjugating enzyme UbcH7 through its kinase domain. PknG thus transfers activated ubiquitin to the conjugating enzyme UbcH7 and later functions as the ubiquitin ligase E3 in transferring ubiquitin to the target host proteins, tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) and TGF- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1) [77]. Ubiquitination of these enzymes results in their degradation, resulting in downregulation of the NF- $\kappa$ B pathway [77].

Several other intracellular bacteria also use STPKs for virulence and infection of the host. *Legionella pneumophila* utilizes the Dot/Icm type IV secretion system to secrete around 300 different virulence effectors into the host cytosol [78]. Amongst them, four STPKs (LegK1, LegK2, LegK4, and LegK7) have emerged to play critical roles in interfering with the host immune response and the cellular trafficking machinery. LegK1 activates the NF- $\kappa$ B signal cascade by phosphorylating the protein kinase inhibitors, I $\kappa$ B and p100, leading to proteasomal degradation [79]. This results in the release of active transcription factors p50/RelA and p52/RelB that translocate to the nucleus and activate NF- $\kappa$ B signaling, leading to an inflammatory cytokine response [79]. In another study, LegK2 interacts directly with the actin nucleation effector ARP2/3 complex [80]. By phosphorylating ARPC1B/APR3 subunits of the ARP2/3 complex, LegK2 impacts global cytoskeleton remodeling. Interestingly, phosphorylation of the host cytoskeleton machinery prevents phagolysosome fusion [80]. Another example of an STPK modulating host signaling is the secretory protein kinase LegK7 [81]. The authors discovered that the host protein MOB1A is a substrate of LegK7 [81]. The MOB1A protein kinase belongs to the canonical Hippo pathway [82]. LegK7-mediated activation of MOB1A allows phosphorylation of its downstream transcriptional coregulators, YAP1 and TAZ, leading to their proteasomal degradation. This results in differential gene expression that allows bacterial survival within macrophages [81]. Finally, the STPK LegK4 has been shown to interfere with the host translation machinery by phosphorylating the Hsp70 chaperone. Phosphorylation affects its ATPase activity, resulting in reduced protein-folding efficiency, thereby affecting protein synthesis [83].

The *Coxiella burnetii* STPK CstK is secreted by a type IV secretion system into the host cytosol to affect the biogenesis of the *Coxiella*-containing vacuole [84]. CstK interacts with TBC1D5, which is a Rab7 GTPase-activating protein. The interaction probably regulates phagosome maturation and bacterial survival within the host [84]. Likewise, the two STPKs PpkA and SiaB of *Pseudomonas aeruginosa* are required for infection [85–87]. PpkA mediates phosphorylation of the protein Fha1, which, in turn, facilitates the secretion of several virulence factors through a type VI secretion system [85]. Conversely, the STPK SiaB, together with phosphatase SiaA, controls the phosphorylation of SiaC [86,87]. Dephosphorylated SiaC forms a complex with the diguanylate cyclase SiaD, allowing the synthesis of cyclic-di-GMP. Cyclic-di-GMP modulates biofilm formation, which enables chronic infections within the host [86,87]. Finally, the StkP of

*S. pneumoniae* phosphorylates the response regulator ComE, which plays a crucial role in modulating intracellular survival of the pathogen. Phosphorylation of ComE influences global transcriptional regulation under acidic stress and favors resistance to cell-wall-damaging antibiotics [88].

### Concluding remarks and future challenges

Recent years have witnessed groundbreaking advances that have deepened our understanding of the role of STPKs in regulating various facets of bacterial physiology. Regulatory insights into the extracellular stimuli of PASTA receptor-containing STPKs have not only paved the way toward the understanding of their mechanistic function but have also shown how bacteria across different species have evolved their use to cater for their specific requisites. Some of the most debated questions in the field of bacterial phosphorylation are thus beginning to be unraveled, notably regarding how STPKs are secreted into the host and how a given STPK governs its own signaling cascade while ensuring coordination with other STPK-regulated cellular processes. Importantly, these studies have also highlighted that some STPKs have novel regulatory roles beyond their kinase activity. Illustrating this, PknG from *M. tuberculosis*, which also functions as a ubiquitinating enzyme marking host proteins for proteasomal degradation, opens unexpected avenues toward the function of STPKs. Importantly, the finding that STPK-mediated phosphorylation also contributes to persistence in the host and modulates antibiotic resistance, positions bacterial STPKs as potential and attractive targets for therapeutics. Armed with this knowledge, an exciting and promising road calls us to travel toward deciphering the multiple regulatory facets of serine/threonine phosphorylation in bacteria (see [Outstanding questions](#)).

### Acknowledgments

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université de Lyon, and the Agence National de la Recherche (ANR-18-CE11-0017-02 and ANR-19-CE15-0011-01). We apologize to colleagues whose original work could not be included due to space limitations.

### Declaration of interests

There are no interests to declare.

### References

- Darwin, C. (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or, the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life* (15th edn), J. Murray
- Macek, B. et al. (2019) Protein post-translational modifications in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 651–664
- Dworkin, J. (2015) Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 24, 47–52
- Manuse, S. et al. (2016) Role of eukaryotic-like serine/threonine kinases in bacterial cell division and morphogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 41–56
- Stock, A.M. et al. (2000) Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 183–215
- Grangeasse, C. et al. (1997) Characterization of a bacterial gene encoding an autophosphorylating protein tyrosine kinase. *Gene* 204, 259–265
- Muñoz-Dorado, J. et al. (1991) A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a Gram-negative bacterium. *Cell* 67, 995–1006
- Grangeasse, C. et al. (2012) Bacterial tyrosine kinases: evolution, biological function and structural insights. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 367, 2640–2655
- Jadeau, F. et al. (2008) Identification of the idiosyncratic bacterial protein tyrosine kinase (BY-kinase) family signature. *Bioinformatics* 24, 2427–2430
- Hanks, S.K. et al. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42–52
- Hanks, S.K. and Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9, 576–596
- Stancik, I.A. et al. (2018) Serine/threonine protein kinases from bacteria, archaea and eukarya share a common evolutionary origin deeply rooted in the tree of life. *J. Mol. Biol.* 430, 27–32
- Pensinger, D.A. et al. (2018) Do shoot the messenger: PASTA kinases as virulence determinants and antibiotic targets. *Trends Microbiol.* 26, 56–69
- Pompeo, F. et al. (2016) Impact of serine/threonine protein kinases on the regulation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Front. Microbiol.* 7, 568
- Shah, I.M. et al. (2008) A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell* 135, 486–496
- Libby, E.A. et al. (2015) The eukaryotic-like ser/thr kinase PrkC regulates the essential WalRK two-component system in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.* 11, e1005275
- Libby, E.A. et al. (2019) Multisite phosphorylation drives phenotypic variation in (p)ppGpp synthetase-dependent antibiotic tolerance. *Nat. Commun.* 10, 5133
- Pompeo, F. et al. (2018) Dual regulation of activity and intracellular localization of the PASTA kinase PrkC during *Bacillus subtilis* growth. *Sci. Rep.* 8, 1660
- Pompeo, F. et al. (2015) Phosphorylation of the cell division protein GpsB regulates PrkC kinase activity through a negative feedback loop in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 97, 139–150

### Outstanding questions

What is the *in vivo* stoichiometry of phosphorylated versus nonphosphorylated forms of a protein?

How does the stoichiometry of phosphorylation correlate towards a biological effect?

What is the level of redundancy between STPKs inside a single cell?

What are the activation signals for cytoplasmic and other membrane STPKs?

Is there a temporal regulation in STPK activity, and does it alternate during the cell cycle?

To what extent are STPKs counteracted by phosphatase activity, and which signals balance the phosphorylation homeostasis?

Could single-cell analyses reveal heterogeneity in the activation status of STPKs within a bacterial population?

20. Fleurie, A. *et al.* (2014) Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. *PLoS Genet.* 10, e1004275
21. Pompeo, F. *et al.* (2018) Investigation of the phosphorylation of *Bacillus subtilis* LTA synthases by the serine/threonine kinase PrkC. *Sci. Rep.* 8, 17344
22. Arora, G. *et al.* (2017) Ser/Thr protein kinase PrkC-mediated regulation of GroEL is critical for biofilm formation in *Bacillus anthracis*. *NPJ Biofilms Microbiomes* 3, 1–12
23. Virmani, R. *et al.* (2019) The Ser/Thr protein kinase PrkC imprints phenotypic memory in *Bacillus anthracis* spores by phosphorylating the glycolytic enzyme enolase. *J. Biol. Chem.* 294, 8930–8941
24. Dhasmana, N. *et al.* (2021) *Bacillus anthracis* chain length, a virulence determinant, is regulated by membrane localized serine/threonine protein kinase PrkC. *J. Bacteriol.* 203, e00582-20
25. Kellogg, S.L. and Kristich, C.J. (2018) Convergence of PASTA kinase and two-component signaling in response to cell wall stress in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 200, e00086-18
26. Hardt, P. *et al.* (2017) The cell wall precursor lipid II acts as a molecular signal for the Ser/Thr kinase PknB of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 307, 1–10
27. Stamsås, G.A. *et al.* (2017) Evidence that pneumococcal Walk is regulated by StkP through protein–protein interaction. *Microbiology* 163, 383–399
28. Bae, H.-J. *et al.* (2017) Inhibition of the DevSR two-component system by overexpression of *Mycobacterium tuberculosis* PknB in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Cell* 40, 632–642
29. Park, E.-J. *et al.* (2019) Dual control of RegX3 transcriptional activity by SenX3 and PknB. *J. Biol. Chem.* 294, 11023–11034
30. Mir, M. *et al.* (2011) The extracytoplasmic domain of the *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr kinase PknB binds specific muropeptides and is required for PknB localization. *PLoS Pathog.* 7, e1002182
31. Kaur, P. *et al.* (2019) LipidII interaction with specific residues of *Mycobacterium tuberculosis* PknB extracytoplasmic domain governs its optimal activation. *Nat. Commun.* 10, 1231
32. Zucchini, L. *et al.* (2018) PASTA repeats of the protein kinase StkP interconnect cell constriction and separation of *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Microbiol.* 3, 197–209
33. Fleurie, A. *et al.* (2014) MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* 516, 259–262
34. Holečková, N. *et al.* (2014) LocZ is a new cell division protein involved in proper septum placement in *Streptococcus pneumoniae*. *mBio* 6, e01700-01714
35. Ulrych, A. *et al.* (2016) Characterization of pneumococcal Ser/Thr protein phosphatase phpP mutant and identification of a novel PhpP substrate, putative RNA binding protein Jag. *BMC Microbiol.* 16, 247
36. Zheng, J.J. *et al.* (2017) Absence of the KhpA and KhpB (JAG/EloR) RNA-binding proteins suppresses the requirement for PBP2b by overproduction of FtsA in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* 106, 793–814
37. Stamsås, G.A. *et al.* (2017) Identification of EloR (Spr1851) as a regulator of cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 105, 954–967
38. Fenton, A.K. *et al.* (2018) Phosphorylation-dependent activation of the cell wall synthase PBP2a in *Streptococcus pneumoniae* by MacP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 2812–2817
39. Hirschfeld, C. *et al.* (2019) Proteomic investigation uncovers potential targets and target sites of pneumococcal serine-threonine kinase StkP and phosphatase PhpP. *Front. Microbiol.* 10, 3101
40. Bergé, M.J. *et al.* (2017) A programmed cell division delay preserves genome integrity during natural genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Commun.* 8, 1621
41. Kang, C.-M. *et al.* (2005) The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes Dev.* 19, 1692–1704
42. Nagarajan, S.N. *et al.* (2015) Protein kinase A (PknA) of *Mycobacterium tuberculosis* is independently activated and is critical for growth in vitro and survival of the pathogen in the host. *J. Biol. Chem.* 290, 9626–9645
43. Chawla, Y. *et al.* (2014) Protein kinase B (PknB) of *Mycobacterium tuberculosis* is essential for growth of the pathogen in vitro as well as for survival within the host. *J. Biol. Chem.* 289, 13858–13875
44. Molle, V. and Kremer, L. (2010) Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Mol. Microbiol.* 75, 1064–1077
45. Baer, C.E. *et al.* (2014) Biochemical and spatial coincidence in the provisional Ser/Thr protein kinase interaction network of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 289, 20422–20433
46. Zeng, J. *et al.* (2020) Protein kinases PknA and PknB independently and coordinately regulate essential *Mycobacterium tuberculosis* physiologies and antimicrobial susceptibility. *PLoS Pathog.* 16, e1008452
47. Boutte, C.C. *et al.* (2016) A cytoplasmic peptidoglycan amidase homologue controls mycobacterial cell wall synthesis. *eLife* 5, e14590
48. Turapov, O. *et al.* (2018) Two faces of CwIM, an essential PknB substrate, in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Rep.* 25, 57–67
49. Kieser, K.J. *et al.* (2015) Phosphorylation of the peptidoglycan synthase PonA1 governs the rate of polar elongation in mycobacteria. *PLoS Pathog.* 11, e1005010
50. Pensinger, D.A. *et al.* (2016) The *Listeria monocytogenes* PASTA kinase PrkA and its substrate YvcK are required for cell wall homeostasis, metabolism, and virulence. *PLoS Pathog.* 12, e1006001
51. Wamp, S. *et al.* (2020) PrkA controls peptidoglycan biosynthesis through the essential phosphorylation of ReoM. *eLife* 9, e56048
52. Garcia-Garcia, T. *et al.* (2021) Ser/Thr kinase-dependent phosphorylation of the peptidoglycan hydrolase CwA controls its export and modulates cell division in *Clostridioides difficile*. *mBio* 12, e00519-21
53. Zheng, W. *et al.* (2018) Autophosphorylation mechanism of the Ser/Thr kinase Stk1 from *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* 9, 758
54. Jarick, M. *et al.* (2018) The serine/threonine kinase Stk and the phosphatase Stp regulate cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* 8, 13693
55. Rausch, M. *et al.* (2019) Coordination of capsule assembly and cell wall biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *Nat. Commun.* 10, 1404
56. Harms, A. *et al.* (2016) Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* 354, aaf4268
57. Germain, E. *et al.* (2013) Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. *Mol. Cell* 52, 248–254
58. Kaspy, I. *et al.* (2013) HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. *Nat. Commun.* 4, 3001
59. Semajski, M. *et al.* (2018) The kinases HipA and HipA7 phosphorylate different substrate pools in *Escherichia coli* to promote multidrug tolerance. *Sci. Signal.* 11, eaat5750
60. Vang Nielsen, S. *et al.* (2019) Serine-threonine kinases encoded by split hipA homologs inhibit tryptophanyl-tRNA synthetase. *mBio* 10, e01138-19
61. Huang, C.Y. *et al.* (2020) hipBA toxin-antitoxin systems mediate persistence in *Caulobacter crescentus*. *Sci. Rep.* 10, 2865
62. Zhou, X. *et al.* (2021) A bacterial toxin perturbs intracellular amino acid balance to induce persistence. *mBio* 12, e03020-20
63. Kristich, C.J. *et al.* (2011) Reciprocal regulation of cephalosporin resistance in *Enterococcus faecalis*. *mBio* 2, e00199-00111
64. Labbe, B.D. and Kristich, C.J. (2017) Growth- and stress-induced PASTA kinase phosphorylation in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 199, e00363-17
65. Labbe, B.D. *et al.* (2019) Reciprocal regulation of PASTA kinase signaling by differential modification. *J. Bacteriol.* 201, e00016-19
66. Cuenot, E. *et al.* (2019) The Ser/Thr kinase PrkC participates in cell wall homeostasis and antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 87, e00005-19
67. Huemer, M. *et al.* (2021) Ser/Thr phospho-regulation by PknB and Stp mediates bacterial quiescence and antibiotic

- persistence in *Staphylococcus aureus*. *bioRxiv* Posted online May 6, 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.05.06.442895>
68. Prust, N. *et al.* (2021) In depth characterization of the *Staphylococcus aureus* phosphoproteome reveals new targets of Stk1. *Mol. Cell. Proteom.* 20, 1–11
  69. Chatterjee, A. *et al.* (2020) Stp1 loss of function promotes  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* that is independent of classical genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64, e02222-19
  70. Kant, S. *et al.* (2017) A novel STK1-targeted small-molecule as an 'antibiotic resistance breaker' against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* 7, 5067
  71. Walburger, A. *et al.* (2004) Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* 304, 1800–1804
  72. Zulauf, K.E. *et al.* (2018) The SecA2 pathway of *Mycobacterium tuberculosis* exports effectors that work in concert to arrest phagosome and autophagosome maturation. *PLoS Pathog.* 14, e1007011
  73. Pradhan, G. *et al.* (2018) Mycobacterial PknG targets the Rab71 signaling pathway to inhibit phagosome-lysosome fusion. *J. Immunol.* 201, 1421–1433
  74. Ge, P. *et al.* (2021) *M. tuberculosis* PknG manipulates host autophagy flux to promote pathogen intracellular survival. *Autophagy* Published online July 7, 2021. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1938912>
  75. Wolff, K.A. *et al.* (2015) A redox regulatory system critical for mycobacterial survival in macrophages and biofilm development. *PLoS Pathog.* 11, e1004839
  76. Khan, M.Z. *et al.* (2017) Protein kinase G confers survival advantage to *Mycobacterium tuberculosis* during latency-like conditions. *J. Biol. Chem.* 292, 16093–16108
  77. Wang, J. *et al.* (2021) *Mycobacterium tuberculosis* protein kinase G acts as an unusual ubiquitinating enzyme to impair host immunity. *EMBO Rep.* 22, e52175
  78. Segal, G. *et al.* (2005) The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 65–81
  79. Ge, J. *et al.* (2009) A *Legionella* type IV effector activates the NF- $\kappa$ B pathway by phosphorylating the I $\kappa$ B kinase family of inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13725–13730
  80. Michard, C. *et al.* (2015) The *Legionella* kinase LegK2 targets the ARP2/3 complex to inhibit actin nucleation on phagosomes and allow bacterial evasion of the late endocytic pathway. *mBio* 6, e00354-00315
  81. Lee, P.-C. and Machner, M.P. (2018) The *Legionella* effector kinase LegK7 hijacks the host hippo pathway to promote infection. *Cell Host Microbe* 24, 429–438.e6
  82. Praskova, M. *et al.* (2008) MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Curr. Biol.* 18, 311–321
  83. Moss, S.M. *et al.* (2019) A *Legionella pneumophila* kinase phosphorylates the Hsp70 chaperone family to inhibit eukaryotic protein synthesis. *Cell Host Microbe* 25, 454–462.e6
  84. Martinez, E. *et al.* (2020) The secreted protein kinase CstK from *Coxiella burnetii* influences vacuole development and interacts with the GTPase-activating host protein TBC1D5. *J. Biol. Chem.* 295, 7391–7403
  85. Mougous, J.D. *et al.* (2007) Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Cell Biol.* 9, 797–803
  86. Chen, G. *et al.* (2020) The SiaA/B/C/D signaling network regulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J.* 39, e105997
  87. Poh, W.-H. *et al.* (2020) The SiaABC threonine phosphorylation pathway controls biofilm formation in response to carbon availability in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 15, e0241019
  88. Piñas, G.E. *et al.* (2018) Crosstalk between the serine/threonine kinase StkP and the response regulator ComE controls the stress response and intracellular survival of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.* 14, e1007118
  89. Bellinzoni, M. *et al.* (2019) Novel mechanistic insights into physiological signaling pathways mediated by mycobacterial Ser/Thr protein kinases. *Microbes Infect.* 21, 222–229
  90. O'Hare, H.M. *et al.* (2008) Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 70, 1408–1423
  91. Rieck, B. *et al.* (2017) PknG senses amino acid availability to control metabolism and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 13, e1006399
  92. Bhattacharyya, N. *et al.* (2018) An aspartate-specific solute-binding protein regulates protein kinase G activity to control glutamate metabolism in mycobacteria. *mBio* 9, e00931-18
  93. Figueira, R. *et al.* (2015) Adaptation to sustained nitrogen starvation by *Escherichia coli* requires the eukaryote-like serine/threonine kinase YeaG. *Sci. Rep.* 5, 17524
  94. Sultan, A. *et al.* (2021) Phosphoproteome study of *Escherichia coli* devoid of Ser/Thr kinase YeaG during the metabolic shift from glucose to malate. *Front. Microbiol.* 12, 657562
  95. Cox, M.M. and Battista, J.R. (2005) *Deinococcus radiodurans* – the consummate survivor. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 882–892
  96. Rajpurohit, Y.S. and Misra, H.S. (2010) Characterization of a DNA damage-inducible membrane protein kinase from *Deinococcus radiodurans* and its role in bacterial radioresistance and DNA strand break repair. *Mol. Microbiol.* 77, 1470–1482
  97. Rajpurohit, Y.S. *et al.* (2016) Phosphorylation of *Deinococcus radiodurans* RecA regulates its activity and may contribute to radioresistance. *J. Biol. Chem.* 291, 16672–16685
  98. Maurya, G.K. *et al.* (2018) Phosphorylation of FtsZ and FtsA by a DNA damage-responsive Ser/Thr protein kinase affects their functional interactions in *Deinococcus radiodurans*. *mSphere* 3, e00325-18
  99. Bidnenko, V. *et al.* (2013) *Bacillus subtilis* serine/threonine protein kinase YabT is involved in spore development via phosphorylation of a bacterial recombinase. *Mol. Microbiol.* 88, 921–935
  100. Wipperman, M.F. *et al.* (2018) Mycobacterial mutagenesis and drug resistance are controlled by phosphorylation- and cardiolipin-mediated inhibition of the RecA coprotease. *Mol. Cell* 72, 152–161.e7
  101. Baronian, G. *et al.* (2015) Phosphorylation of *Mycobacterium tuberculosis* ParB participates in regulating the ParABS chromosome segregation system. *PLoS One* 10, e0119907
  102. Łebkowski, T. *et al.* (2020) AfsK-mediated site-specific phosphorylation regulates DnaA initiator protein activity in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 202, e00597-19
  103. Bischoff, M. *et al.* (2016) Stk1-mediated phosphorylation stimulates the DNA-binding properties of the *Staphylococcus aureus* SpoVG transcriptional factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473, 1223–1228
  104. Alqaseer, K. *et al.* (2019) Protein kinase B controls *Mycobacterium tuberculosis* growth via phosphorylation of the transcriptional regulator Lsr2 at threonine 112. *Mol. Microbiol.* 112, 1847–1862
  105. Pereira, S.F.F. *et al.* (2015) Protein synthesis during cellular quiescence is inhibited by phosphorylation of a translational elongation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E3274–E3281
  106. García García, T. *et al.* (2018) Phosphorylation of the *Bacillus subtilis* replication controller YabA plays a role in regulation of sporulation and biofilm formation. *Front. Microbiol.* 9, 486
  107. Yan, J. *et al.* (2015) Eukaryote-like Ser/Thr protein kinase PrkA modulates sporulation via regulating the transcriptional factor  $\sigma(K)$  in *Bacillus subtilis*. *Front. Microbiol.* 6, 382
  108. Nguyen, K.B. *et al.* (2016) Phosphorylation of spore coat proteins by a family of atypical protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E3482–E3491
  109. Freitas, C. *et al.* (2020) A protein phosphorylation module patterns the *Bacillus subtilis* spore outer coat. *Mol. Microbiol.* 114, 934–951
  110. Ladwig, N. *et al.* (2015) Control of morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by phosphorylation of MreC and PBP2. *PLoS One* 10, e0125425
  111. Riomas, B. *et al.* (2018) Quantitative proteome and phosphoproteome analyses of *Streptomyces coelicolor* reveal proteins and phosphoproteins modulating differentiation and secondary metabolism. *Mol. Cell Proteom.* 17, 1591–1611
  112. Xu, W. and Wang, Y. (2021) Post-translational modifications of serine/threonine and histidine kinases and their roles in signal transductions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 193, 687–716